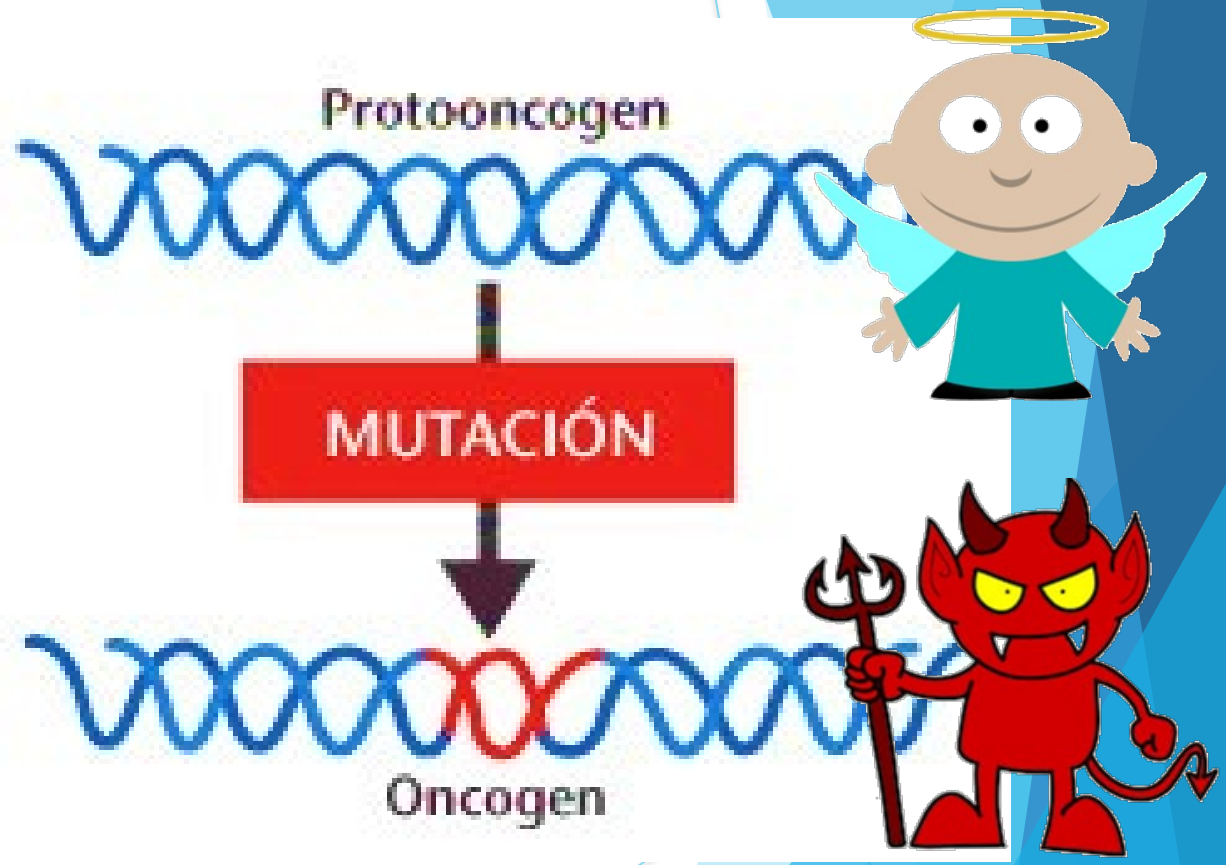
Oncongenes y técnicas básicas de Biología Molecular aplicadas a la medicina

¿Qué son los oncogenes?

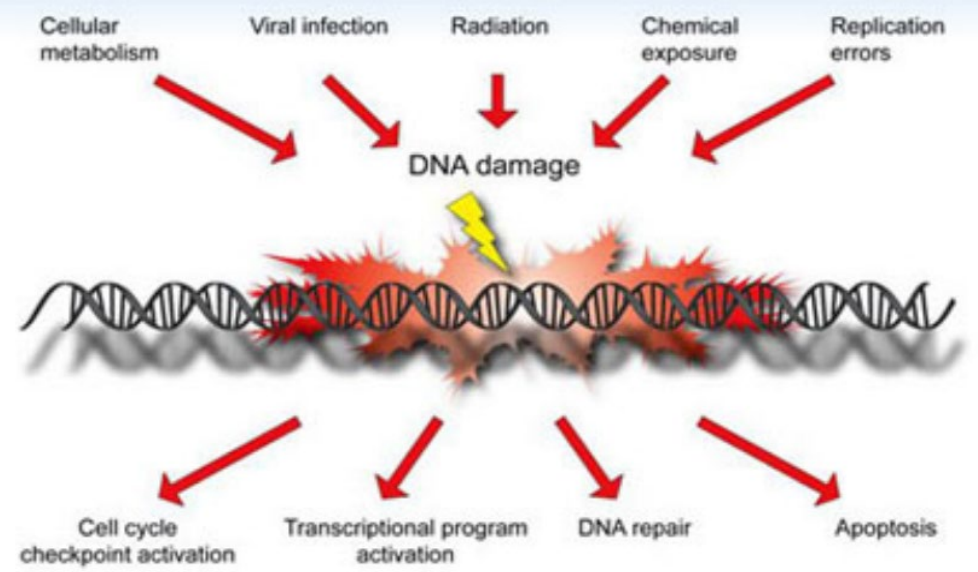
- Los **oncogenes** son genes mutados, anormales que están asociados a la presencia de células tumorales.

- Los oncogenes derivan de genes normales que están presentes en todas las células que son llamados proto oncogenes.



¿Cómo se originan los oncogenes?

- Las principales causas para la activación de los oncogenes son cambios (mutaciones) en las secuencias génicas que no son reparados.
- Estos agentes asociados a la aparición de oncogenes se pueden agrupar en 5 grupos:

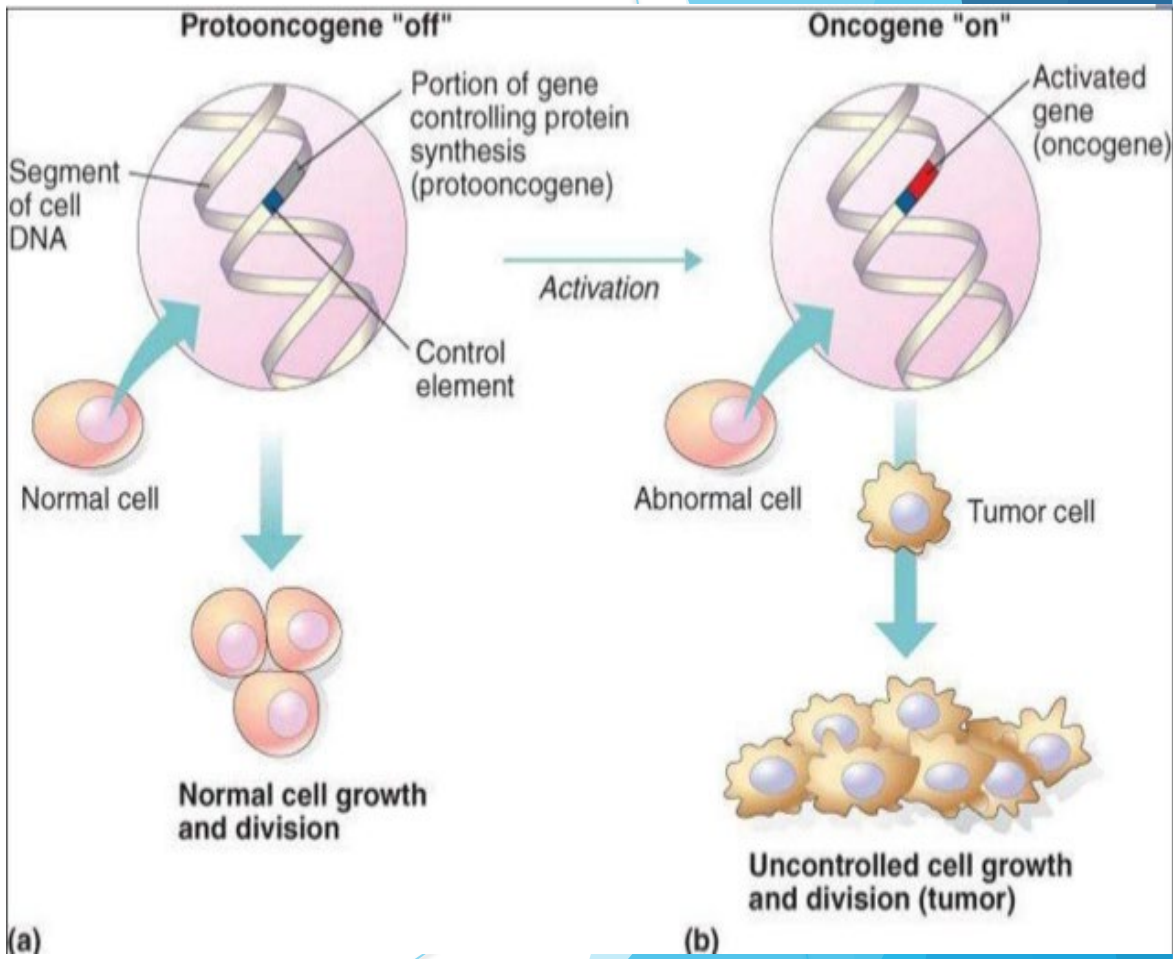


- **1.- Errores en el copiado del DNA.** La tasa de colocación de errores en las polimerasas eucariontes es cercana a 1.2×10^{-12} pb, lo que considerando el tamaño del genoma resulta considerable.
- **2.- Desestabilización génica provocada por agentes virales y retrovirales.** Traslocaciones, inversiones, deleciones e inserciones de secuencias génicas provocadas por elementos virales y semejantes (secuencias Alu, transposones y retrotransposones)
- **3.- Daños en el DNA causados por agentes físicos**. Radiaciones uv, gama, rayos X.
- **4.- Daños en el DNA causado por agentes químicos.** Como son los agentes intercalantes, análogos estructurales, moléculas alquilantes, compuestos desaminadores (precursores del ácido nitroso)
- **5.- Daños en el DNA provocados por radicales libres.** La producción de radicales libres (ROS y RNS) durante un metabolismo alterado que no sean controladas por antioxidantes, o mecanismos de reparación es también una fuente de inestabilidad génica.

La clasificación de los oncogenes

- Los cuatro tipos de oncogenes más comunes se agrupan en las siguientes cuatro tipo de proteínas:

- **Cinasas reguladoras del crecimiento.** como las cinasas dependientes de ciclilnas (CDK) que determinan al entrada en G1 y M
- **Factores de transcripción y elementos nucleares de recombinación**. Generalmente relacionados con la RNApolII, la estabilización de TBP. En este grupo se incluye el translocador genómico *c-myc*
- **Factores de crecimiento.** incluyendo a los reguladores del crecimiento por señales autócrinas como los factores de desarrollo epidérmico (GEF).
- **Proteínas señalizadoras y/o transductoras de señales.** Como las proteínas G y proteínas semejantes a G; ejemplos son *H-ras*, *K-ras* y *N-ras*)

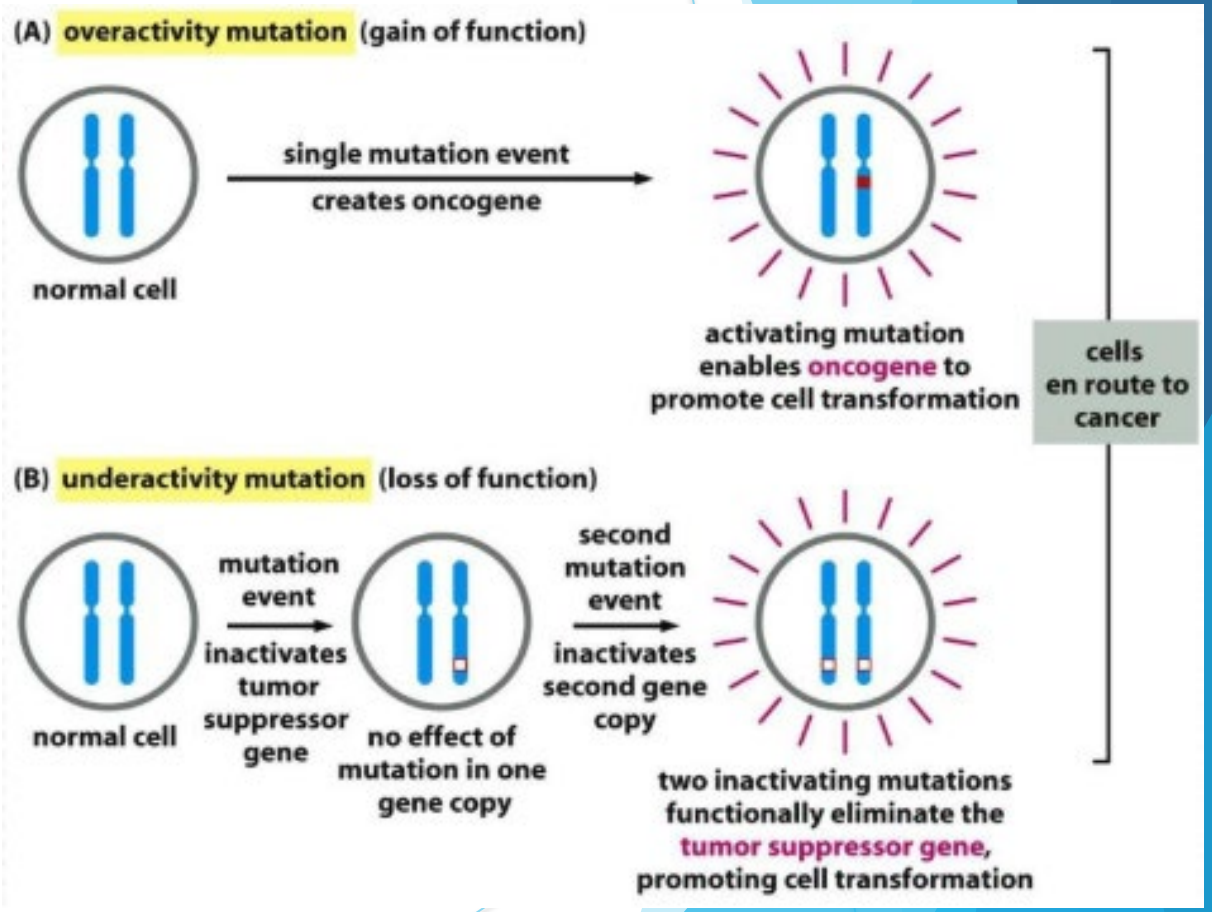


El comportamiento de los oncogenes

- El daño que generan los oncogenes en las células cancerosas se acostumbra dividir según un comportamiento **tipo mendeliano** en oncogenes dominantes y oncogenes recesivos:

- **Dominantes:** en donde el oncogen al tener una *ganancia de función*, basta con que una de las copias se active para derivar en la tumorogénesis.

- **Recesivos:** en este tipo se encuentran los genes supresores de tumores (anti oncogenes) en donde al mutar y *haber pérdida de funciones*, se requiere que más de una copia sea alterada para dar un fenotipo.



Los oncogenes y su asociación a los virus

- **Francis Peyton Roys** en 1911 que los sarcomas (cáncer en tejidos blandos) pueden inducir la formación de tumores en otros organismos (figura). Más tarde al virus causante de estos tumores fue llamado *virus de Rous*.
- Utilizando una nomenclatura de tres letras, al gen del virus del sarcoma aviar responsable de la formación de tumores se le llamó *src*. En la era genómica, se encontraron genes homólogos a src en pollos no infectados, pero también en más amínales invertebrados (incluyendo los seres humanos).

Ejemplos de oncogenes descritos en el genoma humano

Tabla 7-5 Oncogenes selectos, modo de activación y tumores humanos asociados

Categoría	Protooncogén	Modo de activación en el tumor	Tumor humano asociado
Factores de crecimiento			
Cadena β de PDGF	*PDGFB*	Sobreexpresión	Astrocitoma
Factores de crecimiento fibroblásticos	*HST1*	Sobreexpresión	Osteosarcoma
	FGF3	Amplificación	Cáncer de estómago
			Cáncer de vejiga
			Cáncer de mama
			Melanoma
TGF-α	*TGFA*	Sobreexpresión	Astrocitomas
HGF	*HGF*	Sobreexpresión	Hepatocarcinomas
			Cáncer de tiroides
Receptores de factores de crecimiento			
Familia del receptor EGF	*ERBB1 (EGFR)*	Mutación	Adenocarcinoma de pulmón
	ERBB2 (HER)	Amplificación	Carcinoma de mama
Tirosina cinasa 3 afín a FMS	*FLT3*	Mutación puntual	Leucemia
Receptor de factores neurotróficos	*RET*	Mutación puntual	Neoplasia endocrina múltiple 2A y B, carcinomas tiroideos medulares familiares
Receptor del PDGF	*PDGFRB*	Sobreexpresión, translocación	Gliomas, leucemias
Receptor del ligando KIT	*KIT*	Mutación puntual	Tumores del estroma gastrointestinal, seminomas, leucemias
Receptor de ALK	*ALK*	Translocación, formación de gen de fusión	Adenocarcinoma de pulmón, ciertos linfomas
		Mutación puntual	Neuroblastoma
Proteínas que participan en la transducción de las señales			
Proteínas (G) de unión a GTP	*KRAS*	Mutación puntual	Tumores de colon, pulmón y páncreas
	HRAS	Mutación puntual	Tumores de vejiga y riñón
	NRAS	Mutación puntual	Melanomas, enfermedades hematológicas malignas
	GNAQ	Mutación puntual	Melanoma uveal
	GNAS	Mutación puntual	Adenoma hipofisario, otros tumores endocrinos
Tirosina cinasa no ligada a receptores	*ABL*	Translocación	Leucemia mieloide crónica
		Mutación puntual	Leucemia linfoblástica aguda
Transducción de la señal RAS	*BRAF*	Mutación puntual, translocación	Melanomas, leucemias, carcinoma de colon, otros
Transducción de la señal Notch	*NOTCH1*	Mutación puntual, translocación	Leucemias, linfomas, carcinoma de mama
		Reordenamiento génico	
Transducción de la señal JAK/STAT	*JAK2*	Translocación	Trastornos mieloproliferativos
			Leucemia linfoblástica aguda
Proteínas reguladoras nucleares			
Activadores de la transcripción	*MYC*	Translocación	Linfoma de Burkitt
	NMYC	Amplificación	Neuroblastoma
Reguladores del ciclo celular			
Ciclinas	*CCND1* (ciclina D1)	Translocación	Linfoma de células del manto, mieloma múltiple
		Amplificación	Cánceres de mama y esófago
Cinasa dependiente de ciclinas	*CDK4*	Amplificación o mutación puntual	Glioblastoma, melanoma, sarcoma

Referencia de la tabla:
Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. Kumar V. Abbas A y Aster J. 9ª. Edición. España. Elsevier 2015. Pag. 310 a 313, 325 a 332.

Técnicas básicas de Biología Molecular aplicadas a la medicina

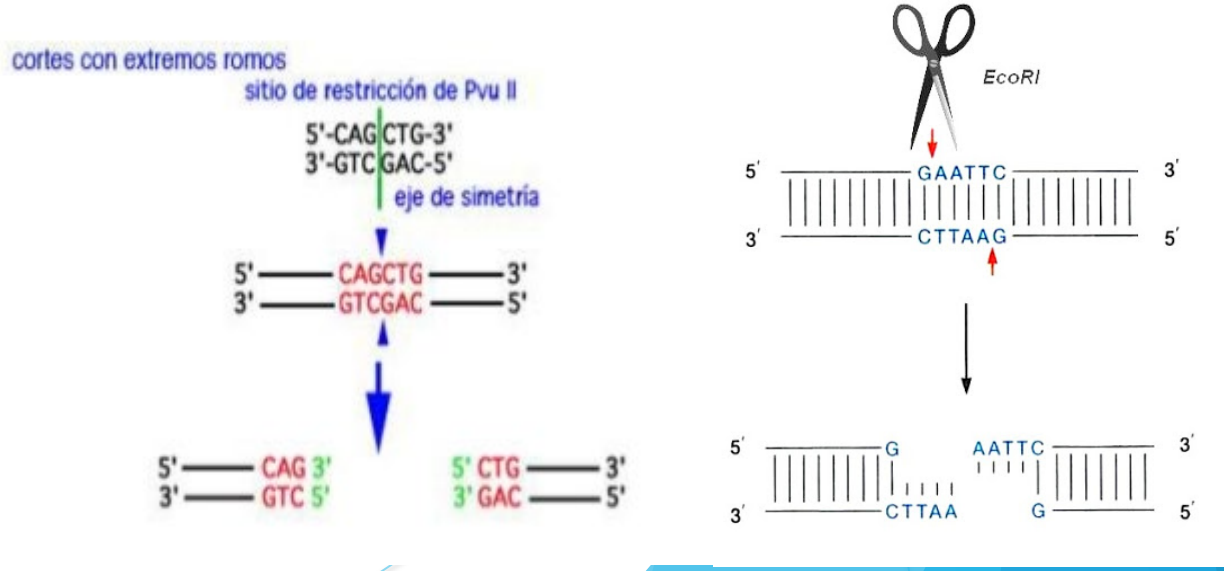
El corte o digestión enzimática del DNA

- Al corte del DNA utilizando endonucleasas bacterianas se le llama **restricción**.

- La acción de las enzimas de restricción pueden ser dejando **extremos romos** (planos) o **extremos adhesivos** (asimétricos).

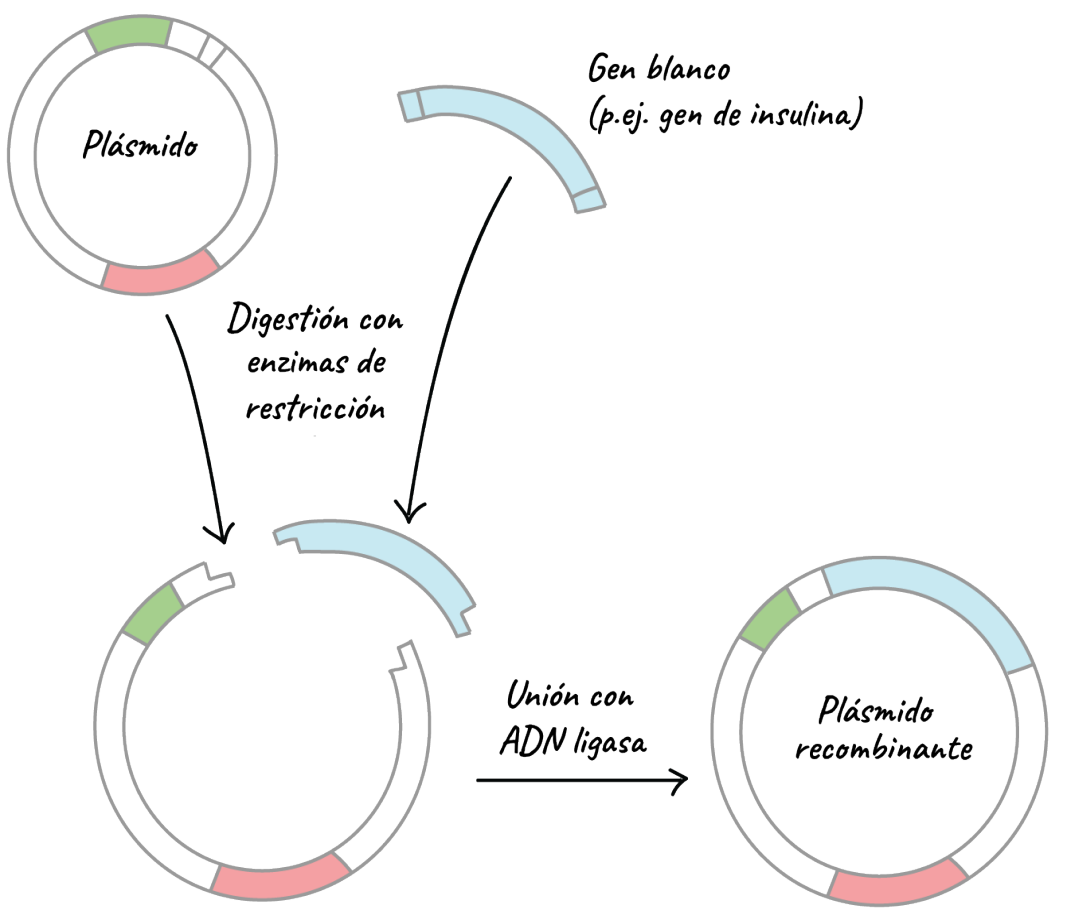
- Estos tipos de corte permiten cortar y, posteriormente con el uso de **ligasas**, pegar (clonar) fragmentos de DNA en diversos *vectores*.

- Los sitios de corte de las enzimas de restricción son **secuencias palindrómicos** (sitios que presentan simetría en la secuencia de ambas cadenas).



La clonación de insertos

- Se le llama **vectores** a los vehículos que pueden portar una secuencia o inserto.
- Los vectores más comunes son los **plásmidos** bacterianos (minicromosomas), pero también están los **cósmidos**, los genomas de **fagos**, **genomas bacteriales** (BAC) y los **cromosomas de las levaduras** (YAC).
- Estos vectores pueden ser utilizados **para guardar información** (vectores de clonación utilizados para construir bibliotecas génicas), o **vectores de sobre expresión**, utilizados para producir productos proteicos en grandes cantidades.

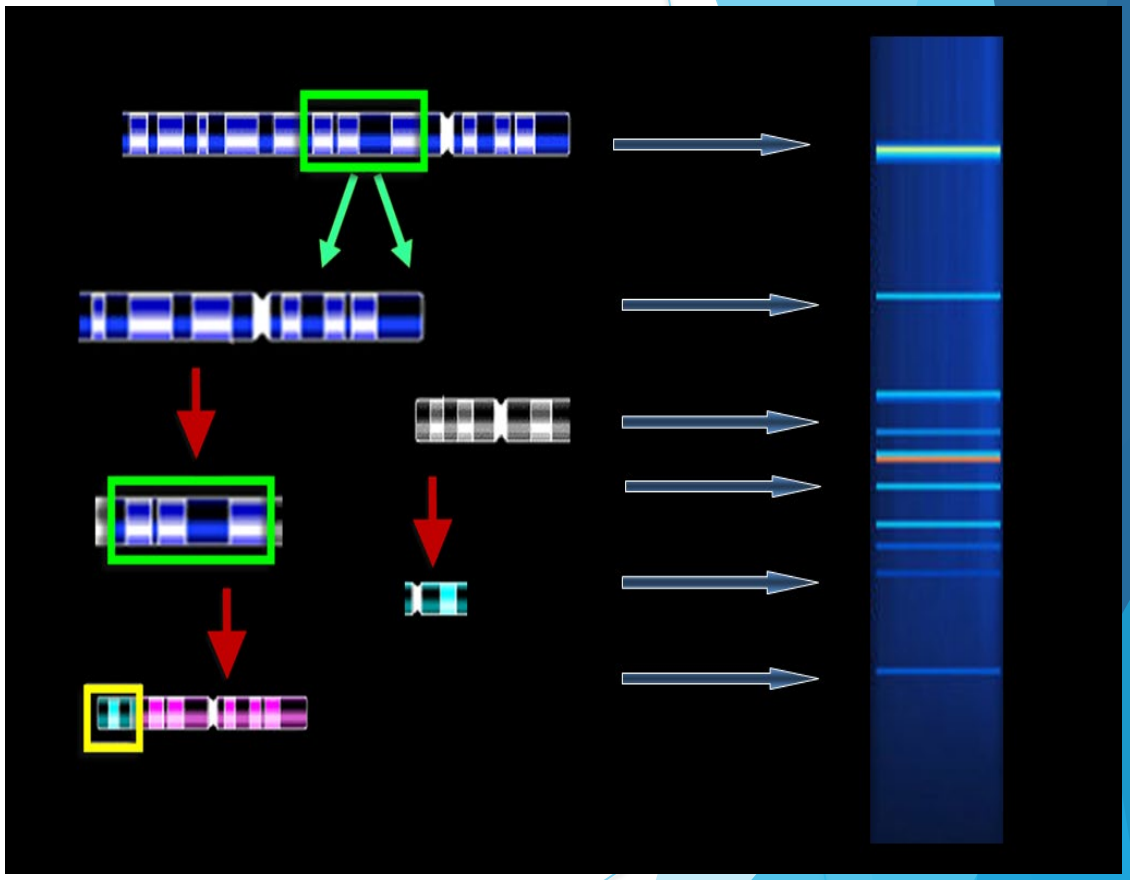


La electroforesis del DNA

- Una vez cortado el DNA, este puede ser colocado en un gel (generalmente de agarosa) para evaluar su progreso en un campo eléctrico **corrimiento electroforético**.

- A mayor longitud de la cadena menor movimiento electroforético. A menor longitud de las cadenas, mayor avance dentro del gel.

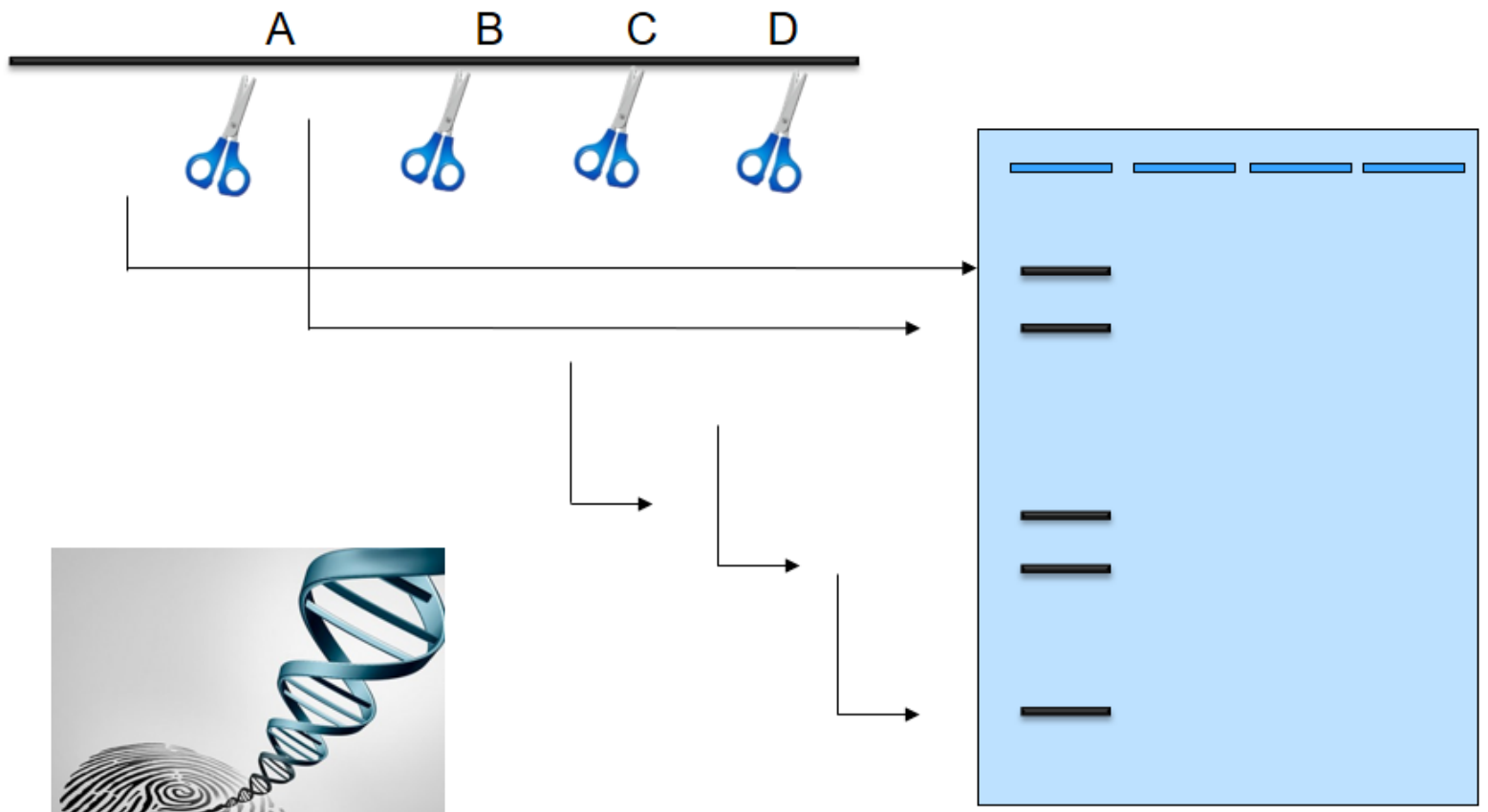
- **Nota.** Tanto el DNA como el RNA poseen carga negativa dada por sus grupos de fosfato.



Las primeras huellas genéticas

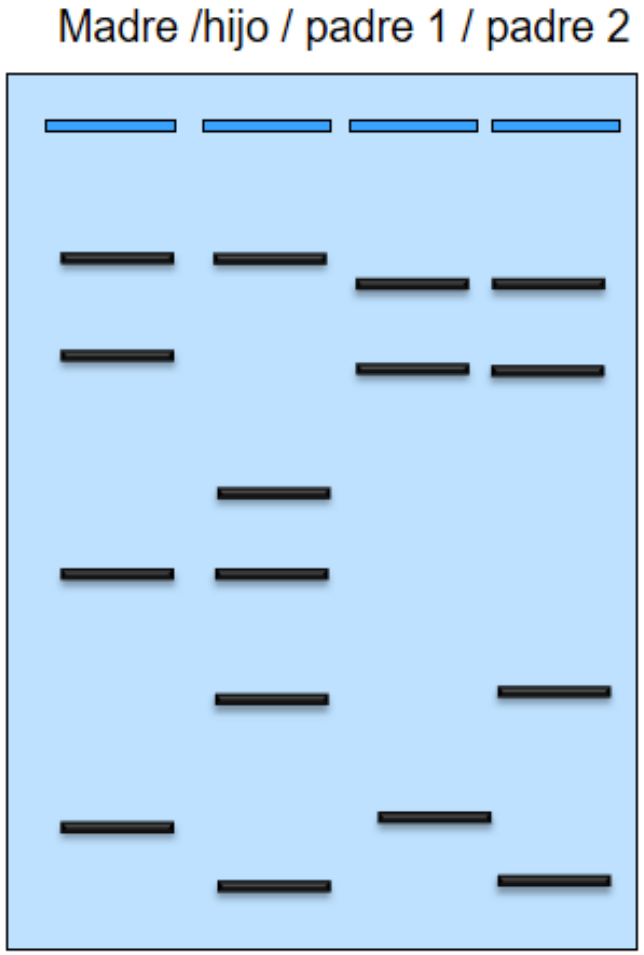
- Dado que los sitios de restricción son heredados de padres a hijos, y hay eventos de recombinación en los genomas, a través del uso de enzimas de restricción se generaron las primeras huellas genéticas llamadas

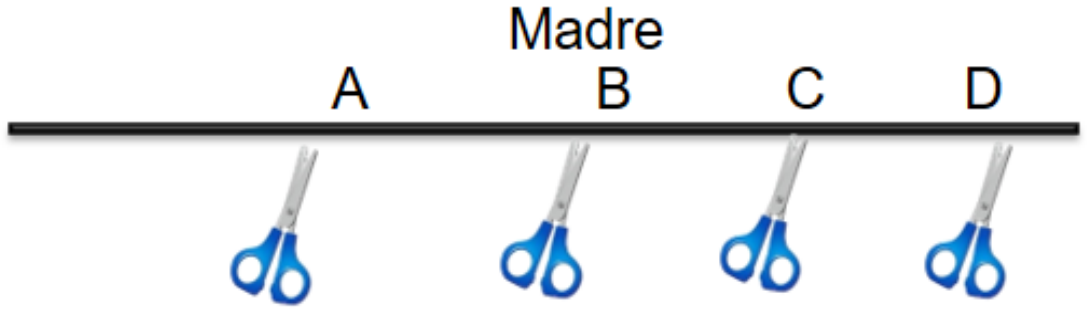
- **RFLP**: *patrones de restricción basados en polimorfismos*.



Al patrón de líneas o bandas en los geles se le llamó “huella genética”

Ejercicio: ¿Quién es el padre?

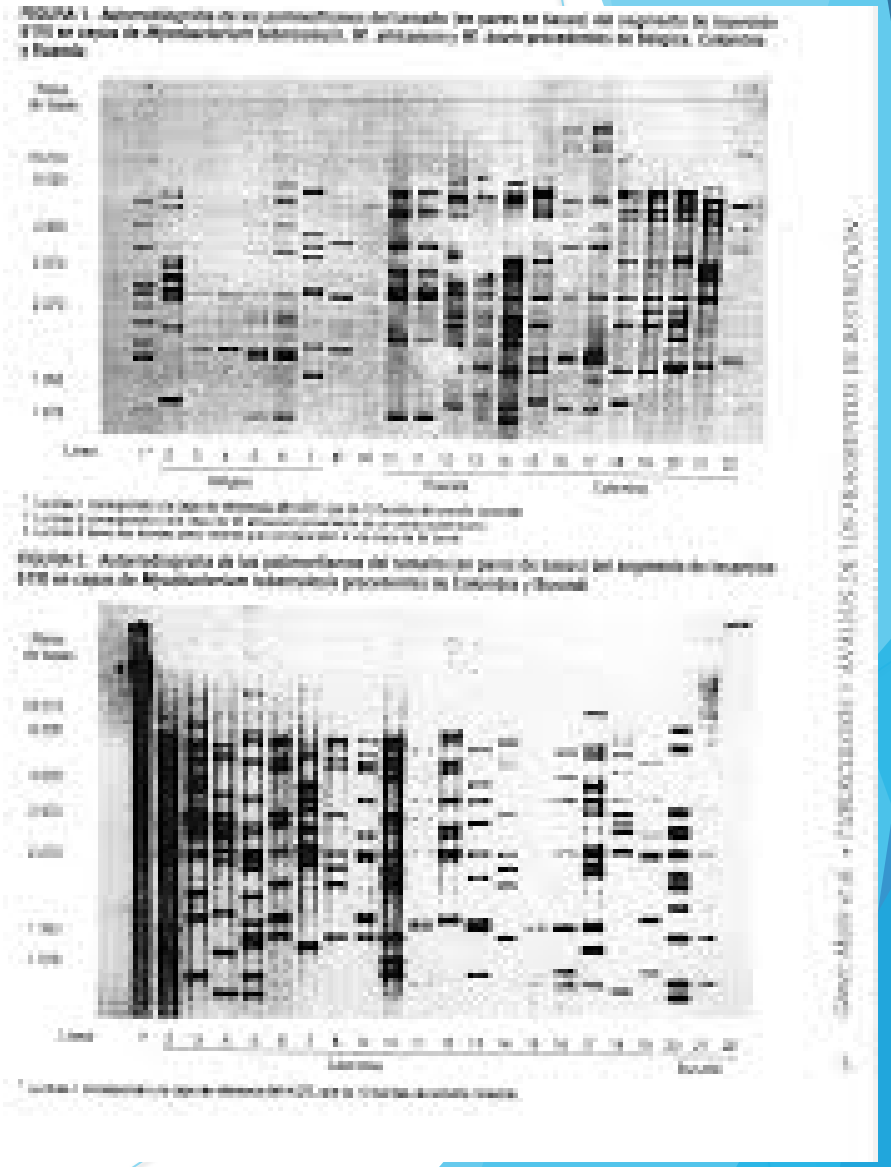




La transición de geles de acrilamida a agarosa

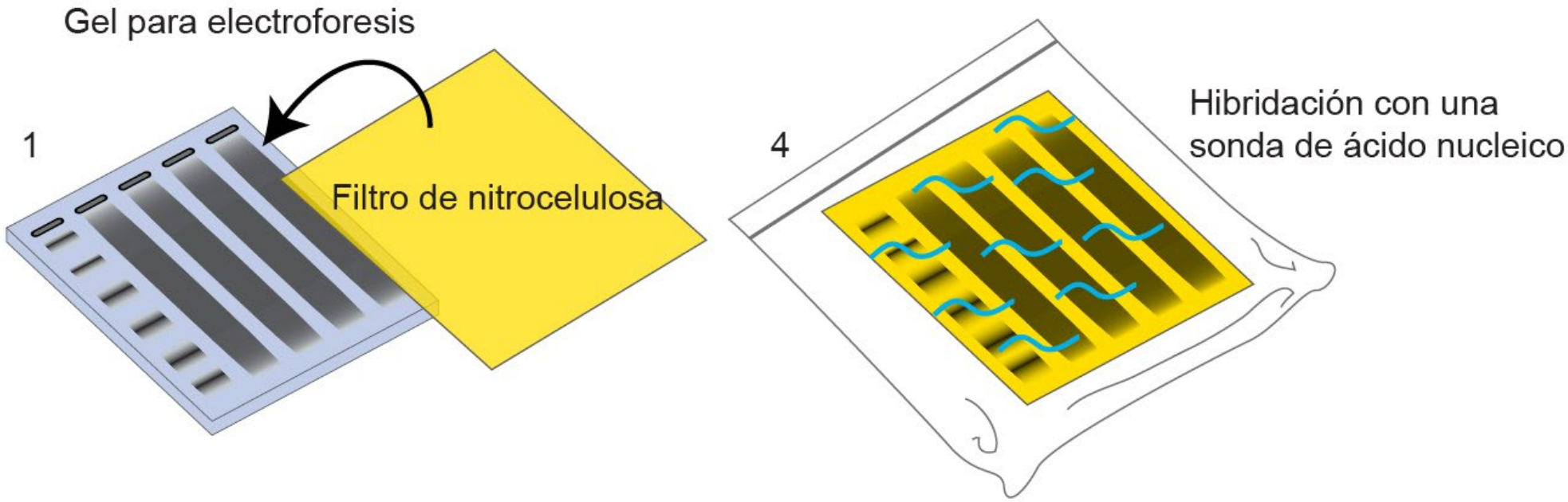
- Con el objetivo de conseguir una mayor resolución en las huellas genéticas, los geles de acrilamida y poliacrilamida se hacían de la mayor longitud posible.

- Pero derivado de la complejidad en la resolución, el corrimiento adecuado en la migración de la electroforesis, así como la fragilidad de los geles, esta técnica fue sustituida por las nuevas huellas genéticas llamadas STR (short tandem repeat) que veremos más adelante.



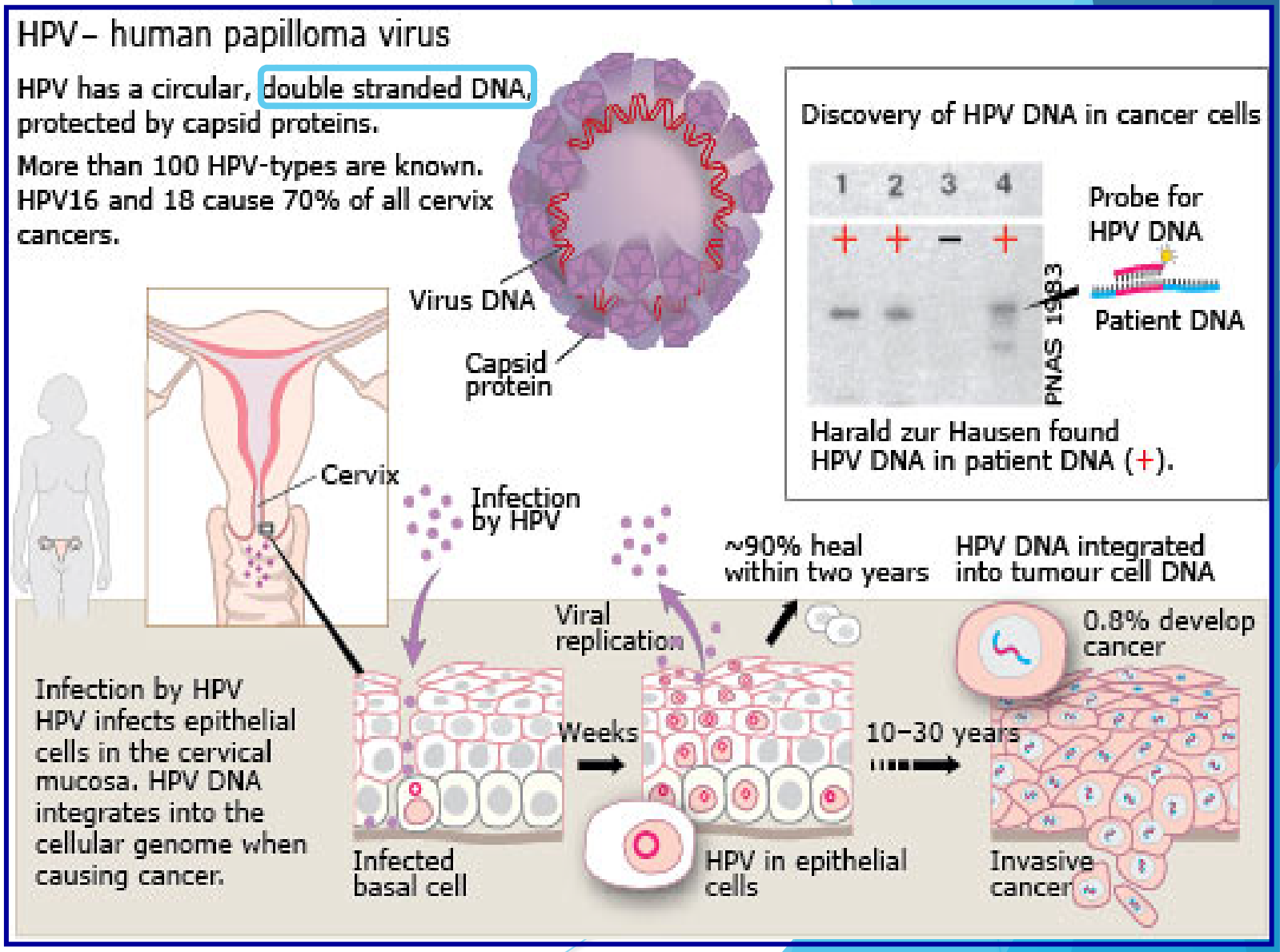
La búsqueda de genes en genomas

- Después de las electroforesis en los geles de agarosa, se pueden realizar transferencias de las bandas a membranas de nylon, nitrocelulosa, o algún otro material, para incubarlos con una sonda de DNA.
- Se llama **sonda** a una secuencia de DNA artificial que es complementaria y se unirá a una **secuencia blanco** dando una señal radiactiva o fluorescente según el tipo de sonda.
- **Si la sonda hibrida, significa que la secuencia complementaria blanco está presente en el DNA analizado**. A esta técnica de hibridación del DNA con sondas de DNA se llamó **Southern blot**.



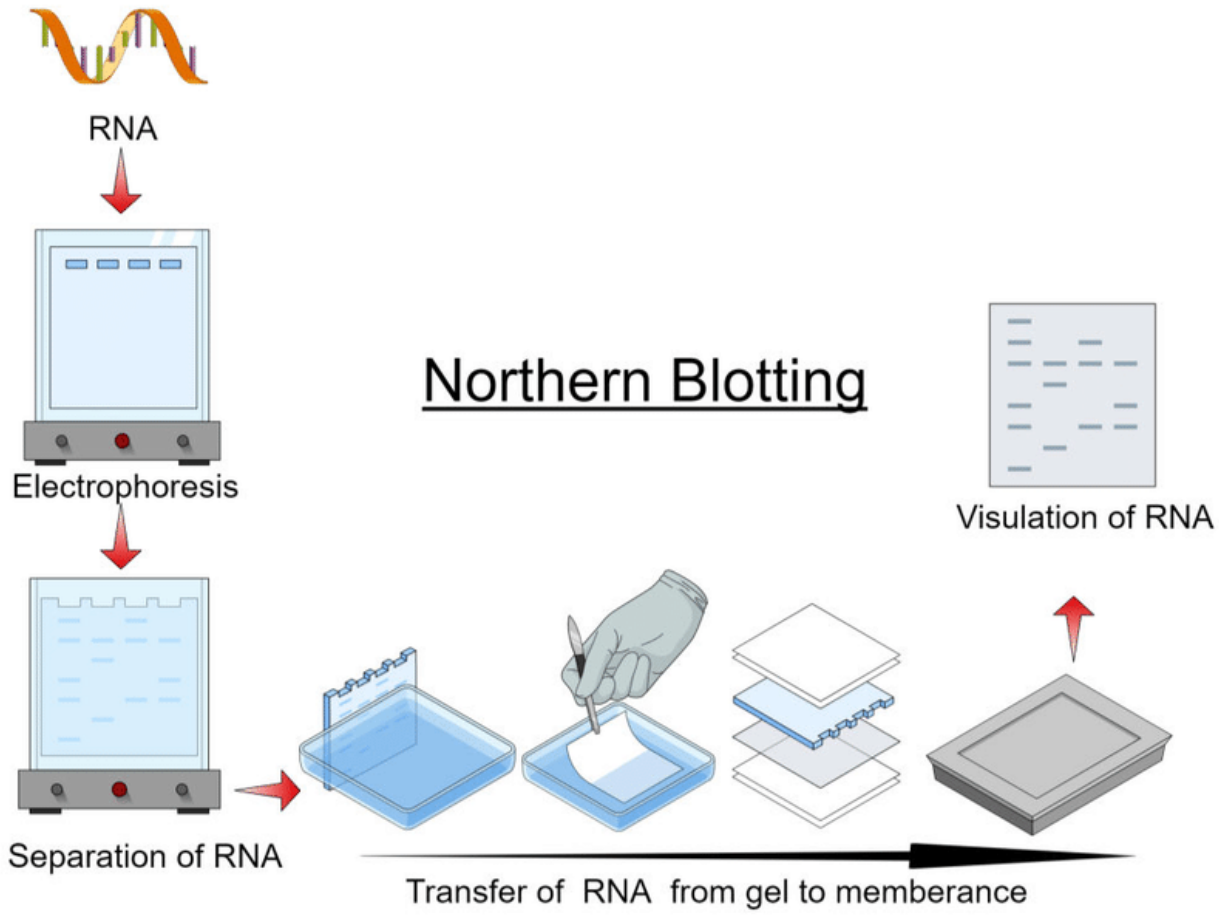
Aplicación clínica de Southern blot

- Después del papanicolau y la colposcopía, se puede realizar un análisis de Southern blot con el DNA obtenido de la muestra.
- En la figura se observa un gel con cuatro muestras, en donde únicamente el carril 3 está libre de la infección por el virus del papiloma humano (VPH).
- El VPH es un virus asociado con el desarrollo de cáncer cérvico uterino.



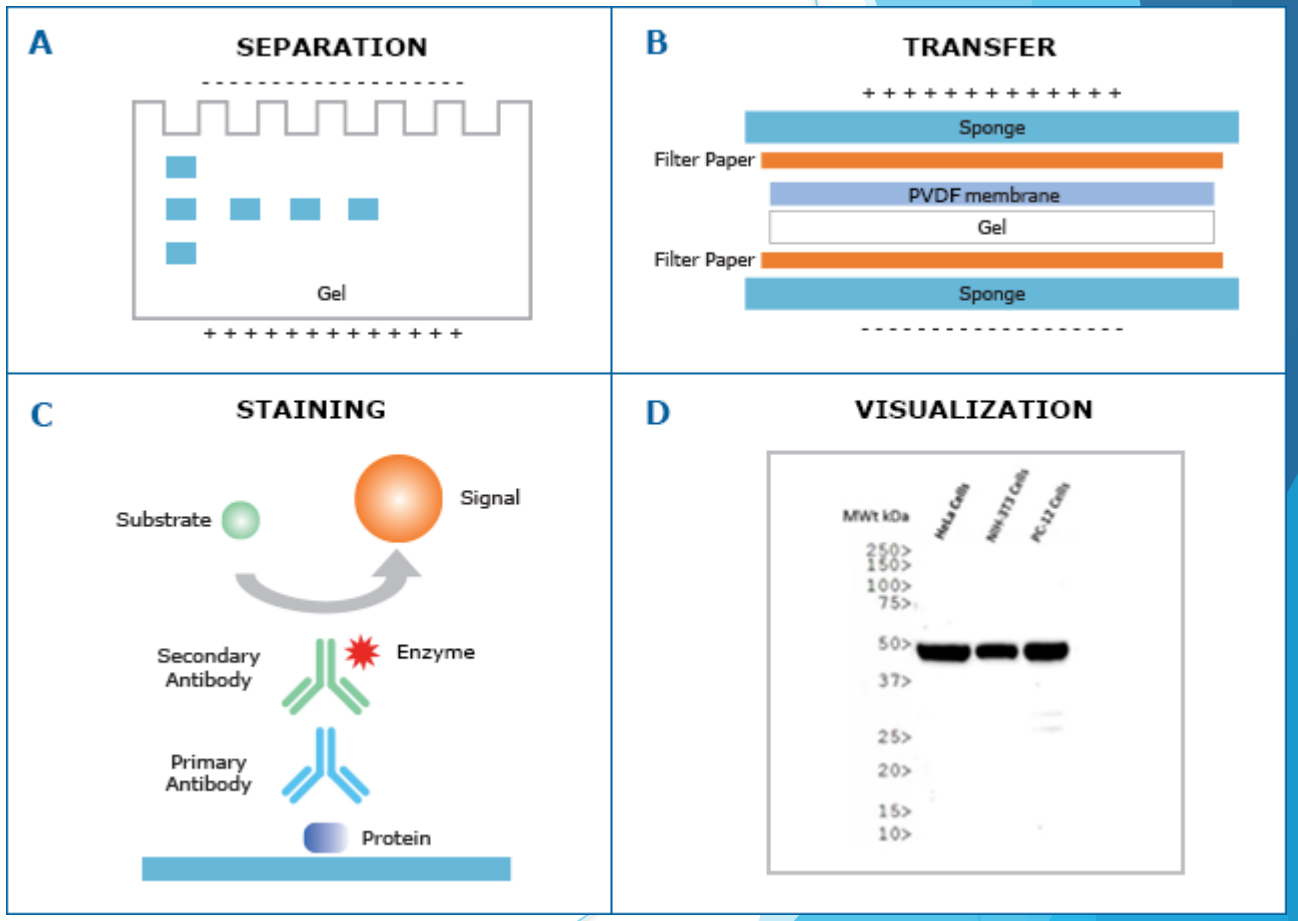
El northern blot

- De manera semejante al Southern blot, la técnica de **Northern blot** permite ubicar secuencias complementarias a una sonda. Pero en este caso el blanco son secuencias de RNA.
- Mientras la técnica de Southern Blot permite ubicar genes en un genoma
- El Northern Blot permite detectar si las secuencias génicas son activas y generan transcritos.
- Esta técnica se ha utilizado **para evaluar la sobreexpresión de oncogenes y la desregulación de genes oncosupresores en células cancerosas** cuando son comparadas con tejidos normales.



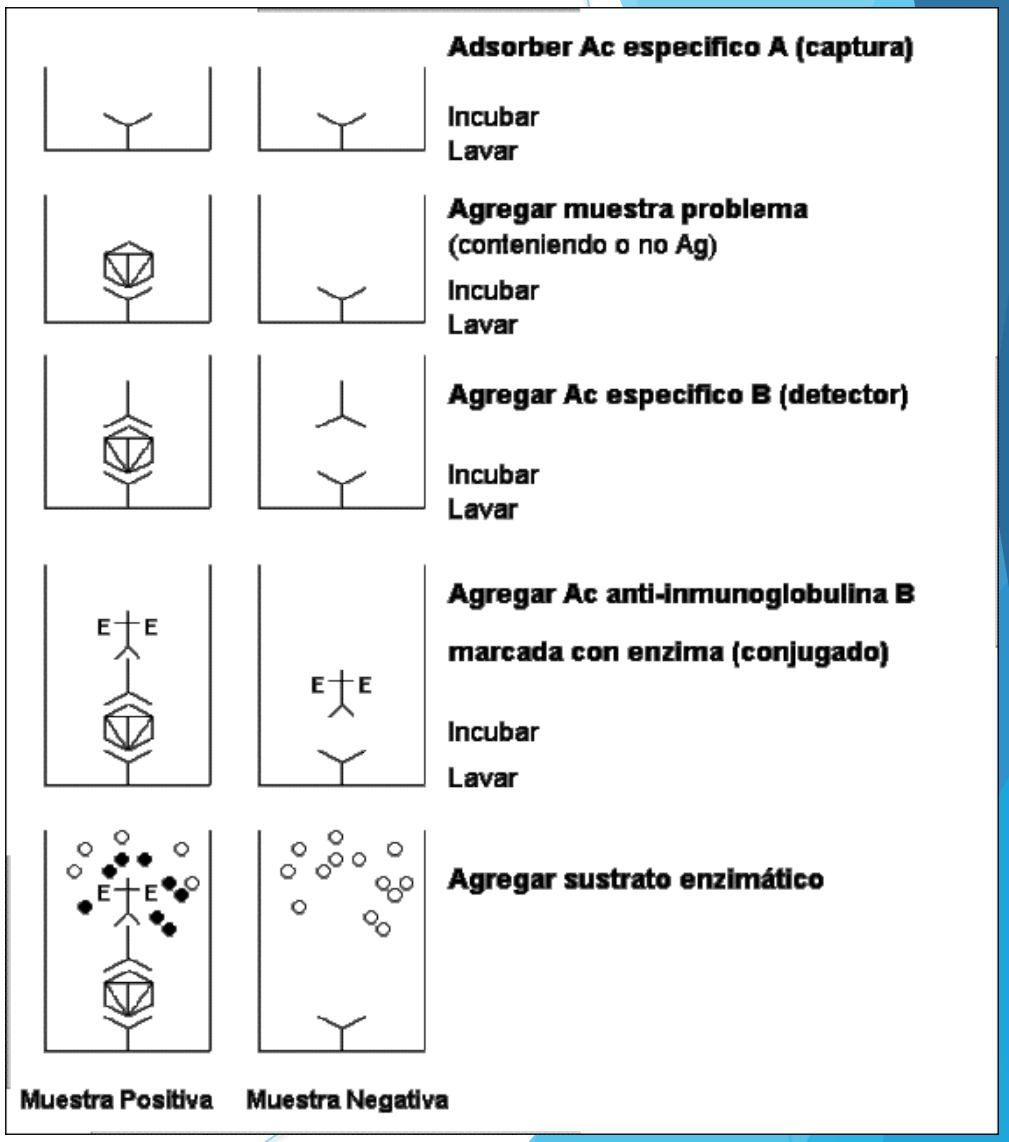
Western blot

- Esta técnica permite la detección de proteínas utilizando anticuerpos que reconocen epitopes particulares.
- Los **epitopes conformacionales** son regiones derivadas del plegamiento proteico, o **epitopes lineales**, reconociendo motivos en la estructura primaria.
- De manera semejante a las dos técnicas anteriores, las proteínas corren en una electroforesis según su longitud.
- A diferencia de los ácidos nucleicos, los péptidos carecen de carga, por lo que se necesita la adición de un compuesto como el dodecil sulfato de sodio (SDS) para darles carga



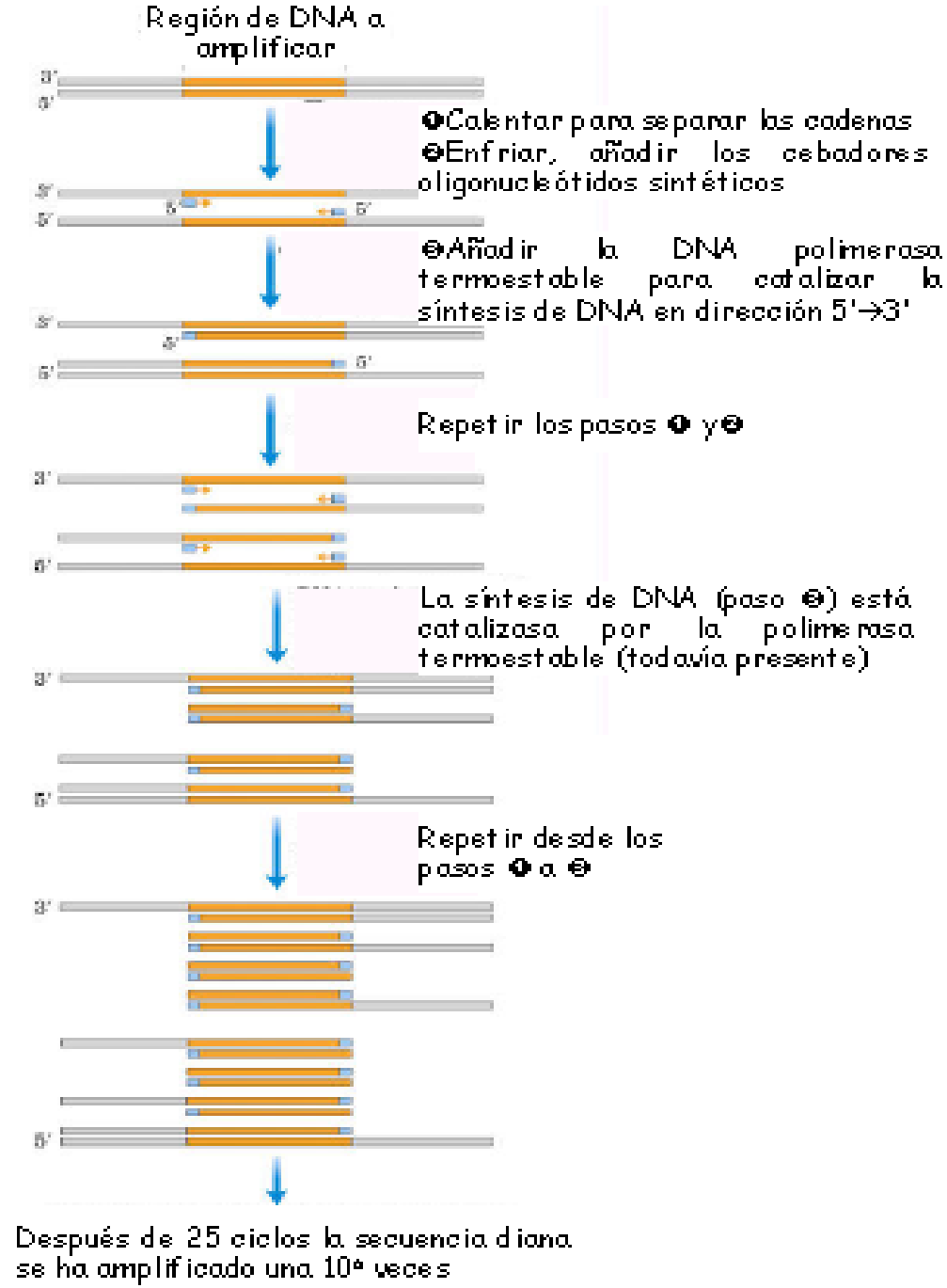
Las pruebas de ELISA

- Una variante del western blot son las **pruebas de ELISA** (*Enzyme linked immunosorbent assay*).
- En esta técnica los anticuerpos se encuentran fijados dentro de cajas y la fase móvil corresponde a la sangre.
- Si el anticuerpo reconoce a una proteína de la cápside viral queda unida, un segundo y tercer anticuerpo se unen para dar una señal fluorescente.
- Si la muestra sanguínea no posee una suficiente carga viral, la muestra no dará negativa.
- Esta técnica es el fundamento de las pruebas de detección del virus de VIH



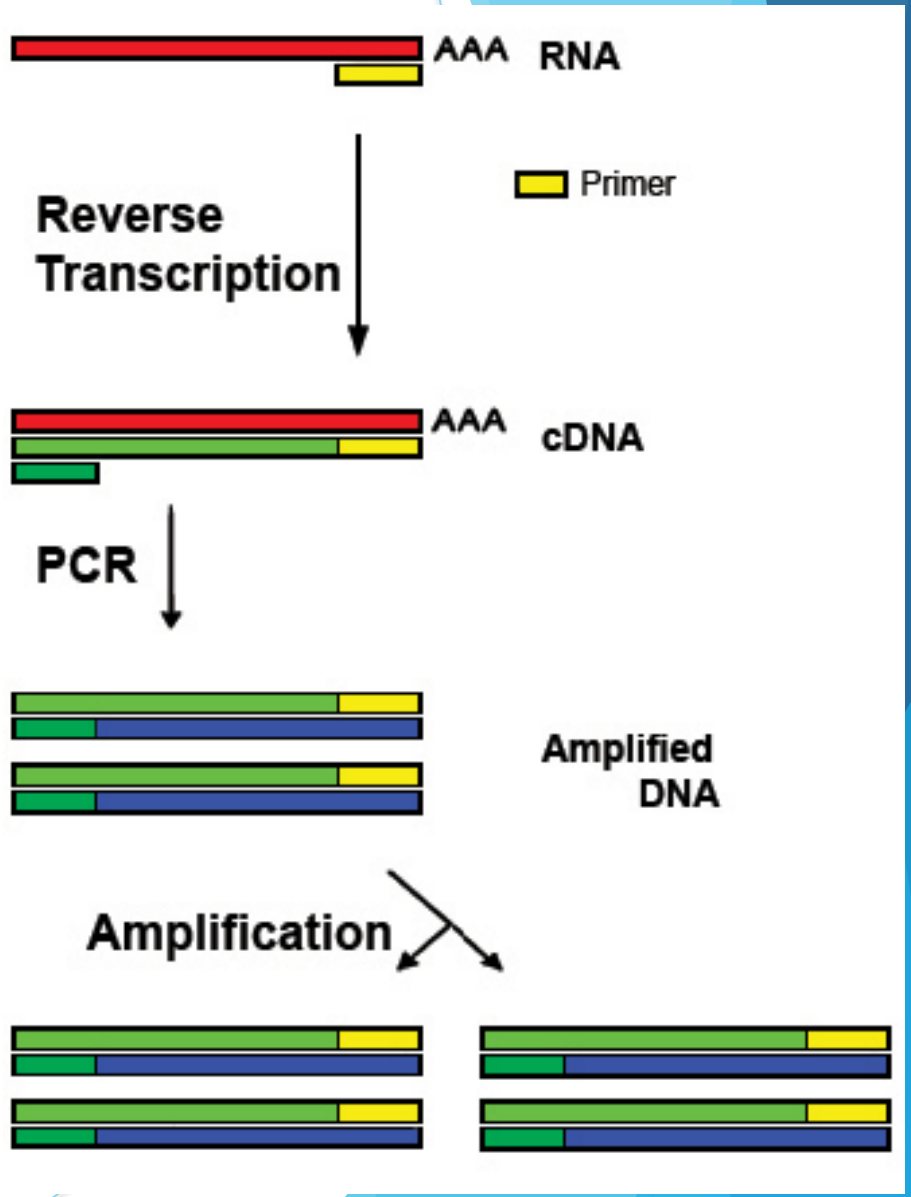
La técnica de PCR

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) **es una técnica que se utiliza para amplificar regiones específicas del DNA**.
- El fundamento de esta técnica es la utilización de oligonucleótidos (primers) que hibridarán de forma complementaria con el DNA que se quiere amplificar
- En la figura se observan los pasos que ocurrirán en 25-30 ciclos.
- La DNA polimerasa que se utiliza debe ser termoresistente para soportar los ciclos de calor que se necesitan para desnaturalizar el DNA.



La reacción en cadena de la polimerasa a partir de RNA (RT PCR)

- Esta técnica es una variante de la PCR que amplifica fragmentos de RNA.
- La base de esta técnica es la utilización de primers complementarios a secuencias ubicadas en el extremos 3’ que servirá como anzuelo para que la proteína Reverso Transcriptasa tome el RNA y forme DNA.
- Esta técnica permite la confirmación de la presencia de VIH



La STR

- La amplificación por PCR también se utiliza para **amplificar secuencias cortas repetidas en serie** (*short tandem repeat*).
- De manera semejante a la PCR y RTPCR se utilizan oligonucleótidos (primers) complementarios al DNA.
- Estos repetidos cortos son individuo específicos, por lo que de su amplificación se obtienen huellas genéticas de gran utilidad para la **criminalística y huellas de paternidad.**
- En la tabla de la derecha se colocan algunos STR utilizados en esta técnica indicando su localización cromosómica, así como el número y tamaño de los alelos.

Locus	Tamaño de los alelos en pb	Localización cromosómica	N.º de alelos
D1S533 (1)	171-203	1p31	9
D1S1656 (4)	129-171	1	11
F13B (2)	165-189	1q31-q32.1	7
TPOX (2) (3)	224-252	2p25.1-pter	8
D3S1358 (3)	114-142	3p	12
D3S1744 (1)	150-182	3q24	9
FGA (1) (3)	273-343	4q28	14/16
D5S818 (2) (3)	11-151	5q23.3-32	10
CSF1PO (2) (3)	295-327	5q33.3-34	10
F13A01 (2)	283-331	6p24.3-25.1	12
D7S820 (1) (2) (3)	215-247	7q 11.21-22	8
LPL (2)	105-133	8p22	7
D8S1179 (3)	128-168	8	10
D9S304 (1)	116-160	9q13	11
TH01 (2) (3)	179-203	11p15.5	7
vWA (2) (3)	139-167	12p12-pter	11
D12S1090 (1)	212-306	12q12	25
D12S391 (4)	209-253	12	12
D13S317 (2) (3)	165-197	13q22-31	9
D14S608 (5)	228-228	14q11.2	8
FESFPS (2) (3)	222-250	15q25-qter	8
D16S3253 (5)	167-195	16q11.2	8
D16S539 (2) (3)	264-304	16q24-qter	11
D18S849 (1)	93-137	18q12-21	10
D18S1270 (4)	268-296	18q21	8
D18S51 (3)	273-341	18q21.3	17
D21S1437 (5)	167-195	21q11.1	8
D21S11 (3)	189-243	21q11-21q21	14
HPRTB (2)	259-303	Xq26	11

1: Lifecodes Corporation, 2: Promega Corporation, 3: Perkin Elmer, 4: Lareu et al., 1996; 1998; 1998a, 5: Choi et al., 2000.

Aplicación de las STR

- En la tabla colocada a la derecha se colocan las claves, la secuencia de los primers, la secuencias cortas repeticas y la longitud de los alelos a amplificar.

- En la siguiente lámina haremos un ejercicio de aplicación

Table 1 - Characteristics of the studied *loci*: primer sequences, GenBank accession number, repeat sequence, allele sizes.

Locus	Primer sequence	GenBank accession	Repeat sequence	Allele size range (bp)
D21S11	A:ATATGTGAGTCAATTCCCCAAG B:TGTATTAGTCAATGTTCTCCAG	M84567	$(TCTA)_n(TCTG)_n$ [(TCTA)3TA(TCTA)3 TCA(TCTA)2TCCAT A] $(TCTA)_n$ - complex	214-240
Penta E	A:GATCAAGACCAGCCTGGGCA B:TGGGTTATTAATTGAGAAAACTCC TTACAATTT	AC027004	AAAGA	260- 300
D18S51	A:CAAACCCGACTACCAGCAAC B:GAGCCATGTTCATGCCACTG	L18333	$(AGAA)_n$	274-318
TH01	A:GTGGGCTGAAAAGCTCCCGATTAT B:GTGATTCCCATTGGCCTGTTCCTC	D00269	$(AATG)_n$	154-178
CSF1PO	A:AACCTGAGTCTGCCAAGGACTAGC B:TTCCACACACCACTGGCCATCTTC	X14720	$(AGAT)_n$	299-323
D7S820	A:TGTCATAGTTTAGAACGAACTAAC G B:CTGAGGTATCAAAAACTCAGAGG	G08616	(GATA)n	198-222
D13S317	A:GTTGCTGGACATGGTATCACAG B:TCAGAGAGCTTGAATTGTTGGT	AF25087	(GATA)n	245-261

A: forward primer; B: reverse primer

¿Es o no el padre?

MARCADORES GENÉTICOS STR	ALELOS PADRE	ALELOS HIJO(A)	ALELOS MADRE
D8S1179	12,15	12,12	12,14
D21S11	27,30	22.2,27	22.2,30
D7S820	10,10	10,10	10,14
CSF1PO	9,10	9,12	8,12
D3S1358	15,16	15,16	12,16
TH01	9.3,10	8,10	8,9
D13S317	10,11	8,11	8,10
D16S539	6,6.2	6,15	9,15
D2S1338	16,17	16,17	14,16
D19S433	10,10	10,12	12,13.2
vWA	10,16	11,16	11,14
TPOX	9,11	8,9	8,11
D18S51	17,17.2	15,17	9,15
AMEL	X,Y	X,Y	X,X
D5S818	11,12	12,13.2	10,13.2
FGA	19,25	20,25	20,21

Actualmente para la toma de DNA basta con epitelios bucales y únicamente la comparación monoparental. No analizando la muestra de padre y madre, lo que disminuye los costos en un 30%

¿Vectores de clonación y sobre-expresión?

Como mencionamos antes, existen diferentes vehículos para el guardado y la sobre expresión del DNA.

En la tabla de la derecha se colocan los principales vectores de clonación junto al tamaño de los insertos que pueden guardar.

Vectores de clonación	Tamaño del inserto
Plásmidos	100 pb – 5-6 kb
Bacteriófagos	10 kb – 20 kb
Cósmidos (plásmidos híbridos, tienen secuencias de λ que dirigen la inserción del DNA en partículas del fago)	30 kb – 40 kb
BAC (cromosoma artificial de bacteria):	100-300 Kb
YAC (Cromosoma artificial de levadura)	0.3 Mb – 1.2 Mb

Según se busque guardar información o hacer una sobre expresión las características de los minicromosomas cambia.

Vectores de clonación:

Función:

Clonar genes y fragmentos de genomas en vectores (vehículos de DNA) con secuencia conocida.

Características:

- Estabilidad (OriC),
- Sitio de clonación múltiple (poli-linker)
- Genes de escrutinio (resistencia a antibióticos)

Vectores de expresión:

Función:

Sobre-expresar proteínas

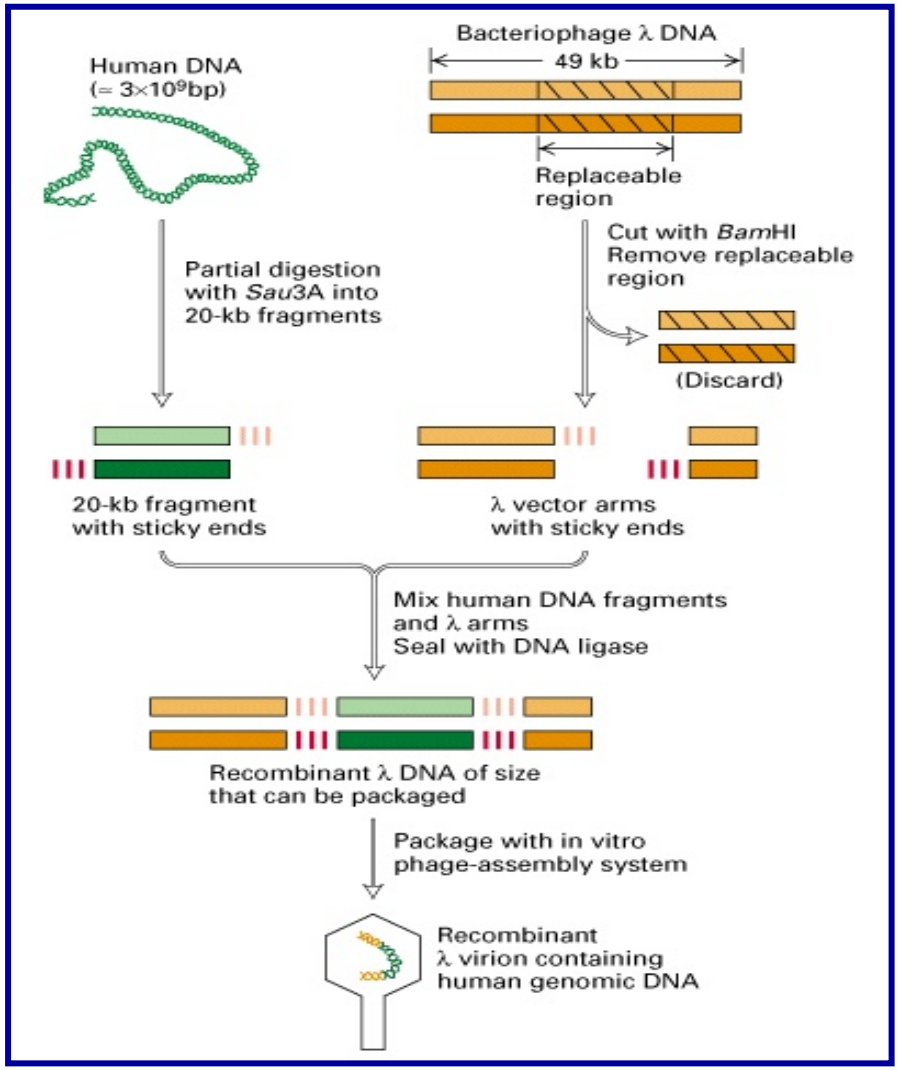
Características:

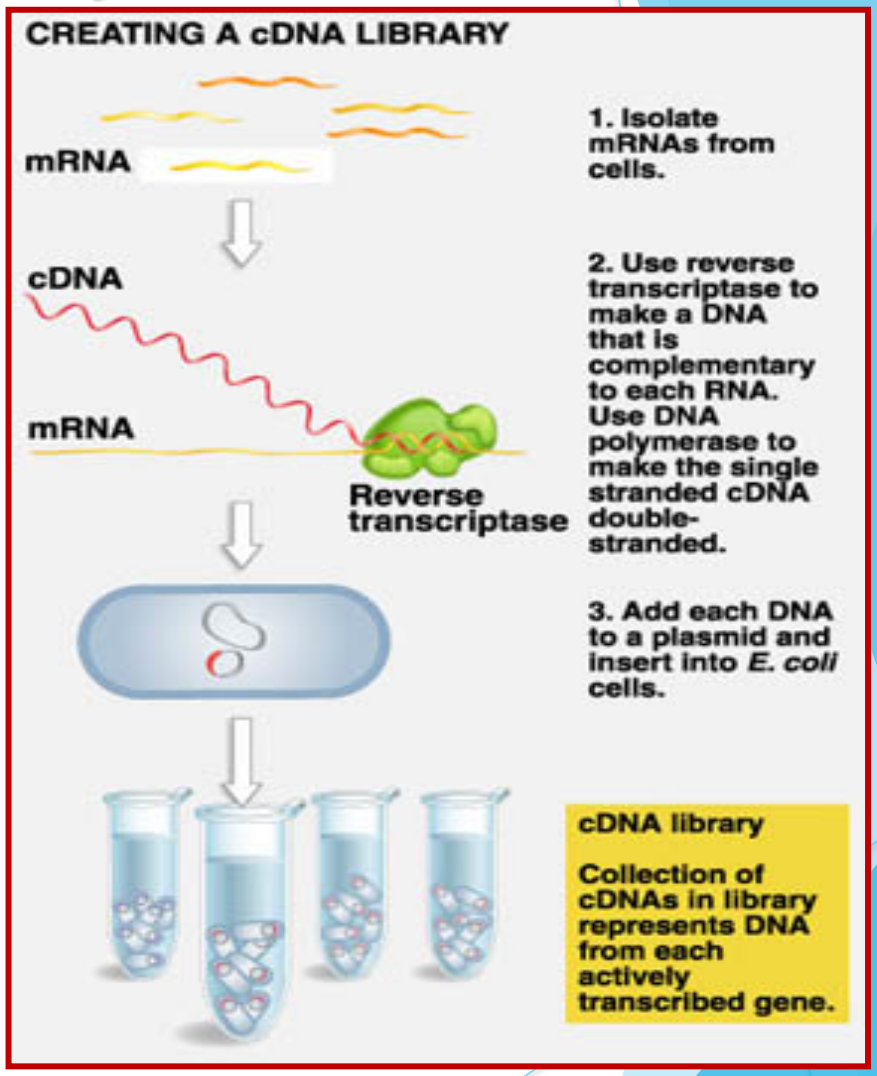
Estabilidad (OriC),

- Sitio de clonación múltiple (poli-linker)
- Genes de escrutinio (resistencia a antibióticos)
- Promotores inducibles.

Genes de escrutinio o reporteros: genes que permiten reconocer a las células transformadas

La bibliotecas de DNA y cDNA





Se llama **biblioteca genómica** a grupos de células transformadas genéticamente (generalmente bacterianas) que contienen la colección total de genes provenientes de un organismo. Las bibliotecas pueden ser de DNA o cDNA (DNA generado a través de la actividad de la reverso transcriptasa).
Las **bibliotecas de cDNA** contienen la genoteca transcripcionalmente activa de un tejido en una condición pues son resultado de la transcripción inversa de RNAm y otros transcritos presentes.

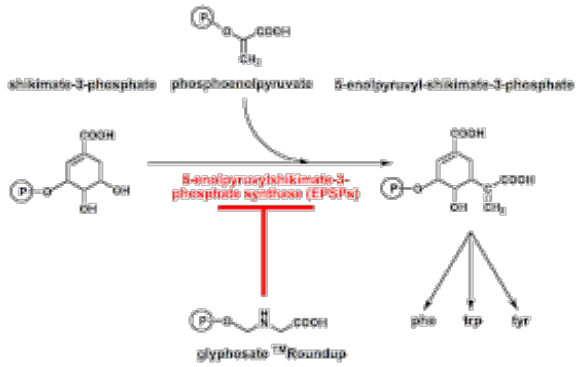
Los organismos transgénicos

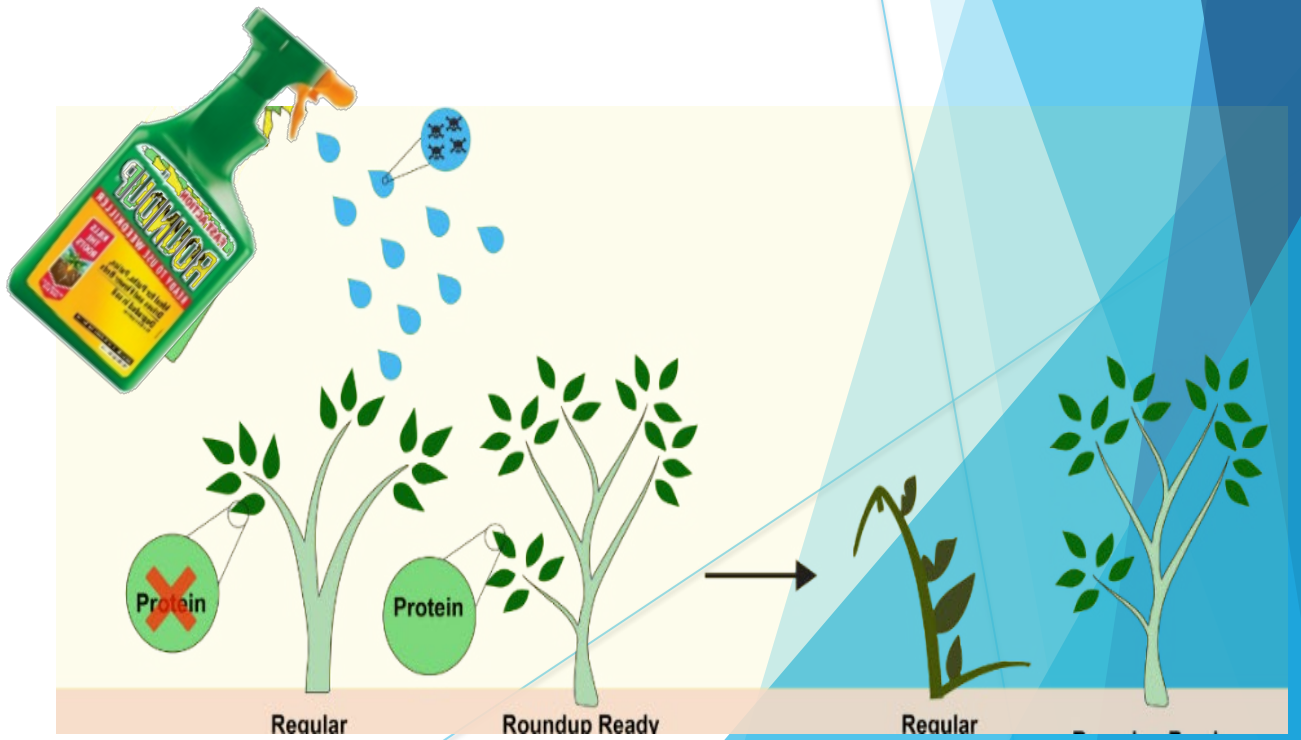
- La colocación de secuencias ajenas a un genoma, genera organismos genéticamente modificados.

- Los mejores ejemplos son las plantas transgénicas ***round up ready***

- En estos transgénicos el **gen de la EPSPS sintasa** (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) de la bacteria A*grobacterium*sp CP4 **se introudce** en el genoma de plantas de interés comercial como soja, maíz, trigo, etc, con lo cual las plantas adquirían resistencia al **pesticida gliofosfato**.

- A la introducción de DNA exógeno en el genoma de bacterias se le denomina **transformación**, en el caso de la modificación del genoma eucariote se llama **transfección**.





Bibliografía

- **Libros consultados:**

- William S. **Klug**. Michael R.Cummings. Charlotte A. Spencer lug mings ncer. Conceptos de. **Genética**. Conceptos de **Genética**. 8ª edición www.librosite.net/**klug**.
- Biologia Celular. "**Biología celular y molecular : conceptos y experimentos**: séptima edición. Editorial: McGraw-Hill.

- **Artículos para tomar como referencia:**

- 1.- Dodurga Y., Seçme M., Lale Şatıroğlu-Tufan N. A novel oncogene URG4 / URGCP and its role in cancer. Gene. 2018; 668: 12–17.
- 2.- Bell, JC. Oncogenes. Cancer Letters. 1988; 40 (1): 1–5.
- 3.- Meza J., Montano A., Aguayo Á. Bases moleculares del cáncer. Revista de Investigación Clínica. 2006; 58 (1): 56-70.
- 4.- Astrin SM., Rothberg PG. Oncogenes and Cancer. Cancer Investigation. 1983; 1 (4): 355-364.
- 5.- Weinstein IB. Addiction to Oncogenes—the Achilles Heal of Cancer. Science. 2002; 297: 63-74.