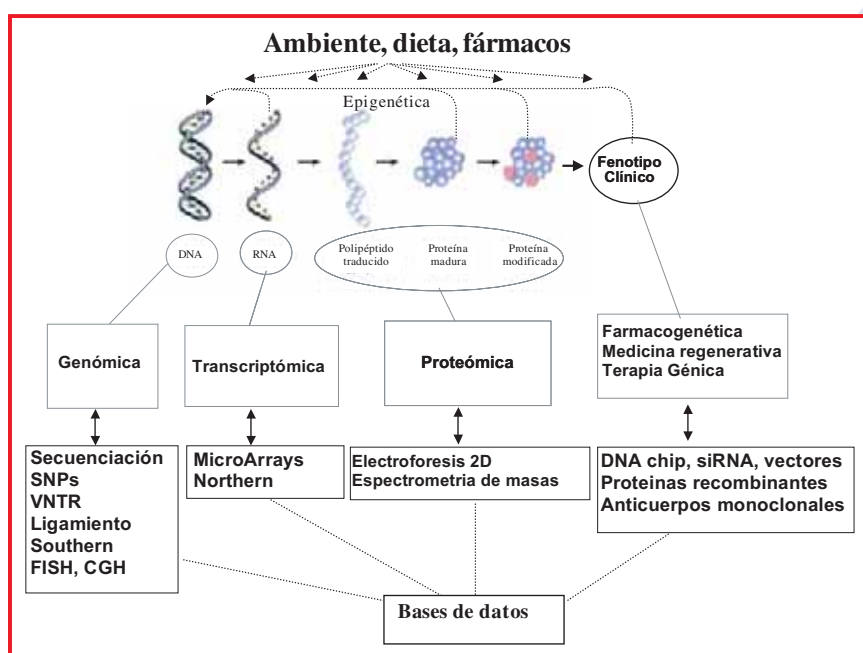


GENOMA HUMANO

Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento

Rafael Oliva Virgili
José-Manuel Vidal-Taboada



GENOMA HUMANO

Nuevos avances en investigación,
diagnóstico y tratamiento

RAFAEL OLIVA VIRGILI
JOSÉ-MANUEL VIDAL-TABOADA

Publicacions i Edicions



UNIVERSITAT DE BARCELONA



PRESENTACIÓN

Este libro ha sido redactado específicamente para servir de material de apoyo o complemento de las asignaturas “Genoma Humano y nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento” y “Genoma Humano y Genómica: aplicaciones a la investigación biomédica”, impartidas por los profesores de Unidad de Genética del Departamento de Ciencias Fisiológicas I de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Los temas corresponden a la materia teórica impartida en clase y a las prácticas a realizar. El texto se ha estructurado en 14 temas y en 4 prácticas. El texto pretende evitar tener que copiar datos en exceso durante la clase liberando al estudiante para comprender e integrar mejor los conceptos. Se ha incluido también material gráfico extenso que resultaría difícil de tomar en forma de apuntes coincidiendo con la clase. No se pretende sustituir completamente la consulta de los excelentes textos de disponibles sobre el genoma y nuevas tecnologías en Biomedicina. De hecho, a lo largo del texto se anima al estudiante a la consulta de fuentes adicionales.

Las 4 prácticas incluidas al final corresponden a diversas actividades orientadas a adquirir agilidad en la búsqueda de secuencias en Internet, en su análisis y en la interpretación de los resultados. Las prácticas requieren acceso a Internet ya sea desde las salas de ordenadores de las distintas facultades o desde casa.

Si bien este texto se ha concebido inicialmente con una finalidad docente, puede resultar también útil a estudiantes o profesionales de otras disciplinas interesados en actualizar sus conocimientos en el tema. Dada la rapidez con que avanzan las metodologías en Biomedicina, a veces resulta difícil encontrar libros actualizados que combinen un lenguaje no excesivamente técnico con una visión actual del tema. Pensamos que este texto tiene el potencial de contribuir a mejorar este aspecto.

Finalmente se espera que este texto pueda mejorar en ediciones sucesivas. Óptimamente la agilidad de publicación debería de permitir una edición anual o bianual que incorpore tanto mejoras basadas en las críticas como en los nuevos avances y tendencias pedagógicas. En este sentido se agradecerá la comunicación (roliva@ub.edu, o roliva@clinic.ub.es) de cualquier sugerencia, corrección o adición que pueda contribuir a mejorar este texto en sucesivas ediciones.

Rafael Oliva
Coordinador Unidad de Genética,
Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona

AUTORES

Dr. Rafael Oliva Virgili. Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, Coordinador de la Genética Médica, y Especialista Senior del Servicio de Genética del Hospital Clínico. Doctorado en Medicina y Cirugía (1986), Postdoctoral en el Departamento de Bioquímica Médica de la Universidad de Calgary, Canadá (1986-1989), Postdoctoral en el Centro del Genoma Humano, Laboratorios Lawrence Berkeley, USA (1989-1990).

Dr. José-Manuel Vidal-Taboada. Profesor Asociado de Genética Médica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Barcelona (2000). Director de Proyectos de Farmacogenética y Farmacogenómica para la industria farmacéutica (2000-)

AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los comentarios aportados por el **Profesor Cristóbal Mezquita Pla** (Catedrático de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona. Doctorado en Medicina y Cirugía en 1974. Postdoctoral en el Baylor College of Medicine, Houston, Texas, en 1974-1978. Decano Facultad de Medicina en 1990-1995).

ÍNDICE

TEMA 1. GENOMA HUMANO Y ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LOS GENES

R.Oliva

1.1. Composición del genoma humano.	13
1.2. Genoma nuclear y genoma mitocondrial. Nomenclatura de los cromosomas.	16
1.3. Organización de la secuencia del genoma y número de genes.	16
1.4. Estructura de los genes. Exones. Intrones. Transcripción. Splicing.	18
1.5. Traducción. Código genético.	19
1.6. Regulación de la expresión génica.	21
1.7. Principios de la Evolución del genoma human	24
1.8. Mutación del genoma	24
1.9. Mecanismos de generación de diversidad funcional en los productos génicos.	34
Bibliografía	35

TEMA 2. BASES METODOLÓGICAS DEL ANÁLISIS GENÉTICO

R. Oliva

2.1. Aislamiento de ácidos nucleicos	37
2.2. Enzimas de restricción.	38
2.3. Generación de recombinantes.	40
2.4. Clonación molecular.	40
2.5. Electroforesis de ácidos nucleicos.	41
2.6. Hibridación molecular	42
2.7. Análisis Southern.	42
2.8. Síntesis de oligonucleótidos	43
2.9. PCR.	43
2.10. Secuenciación del DNA.	45
2.11. Microarrays y DNA chips	47
Bibliografía	47

TEMA 3. RESULTADOS DERIVADOS DEL PROYECTO GENOMA HUMANO

JM. Vidal y R. Oliva

3.1. El Proyecto Genoma.....	49
3.2. Resultados e información disponible derivados del análisis del genoma.....	51
3.3.Repercusión de los avances del PGH	53
3.4. La continuación del PGH	55
3.5.Aplicaciones para la investigación Biomédica.....	56
3.6. Aplicaciones médicas y clínicas	56
Bibliografía	58

TEMA 4. FUENTES DE DOCUMENTACIÓN, BASES DE DATOS, Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

JM. Vidal y R. Oliva

4.1. Introducción	59
4.2. Almacenamiento y representación de la información biomédica.....	60
4.3. Bases de datos moleculares	63
4.4. Recursos para el análisis de secuencias.....	68
Bibliografía	71

TEMA 5. ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

R. Oliva

5.1. Alternativas para el análisis genético	73
5.2. El cariotipo humano	74
5.3. Citogenética molecular.....	78
5.4. Métodos diagnósticos de alteraciones moleculares	79
5.5. OMIM: On Line Mendelian Inheritance In Man.....	81
Bibliografía	82

TEMA 6. ESTRATEGIAS CLÁSICAS PARA LA BÚSQUEDA DE GENES RESPONSABLES DE ENFERMEDADES

JM Vidal y R. Oliva

6.1. Profesionales que participan en la búsqueda de genes responsables de enfermedades	83
6.2. Estudios genéticos	84
6.3. Herramientas para examinar la contribución del genotipo	84
6.4. Diseño y análisis de estudios genéticos.....	87
6.5. Estrategias clásicas de búsqueda de genes responsables de enfermedades	88
6.6. Confirmando un gen candidato	98
6.7. Búsqueda de genes en enfermedades complejas	98
6.8. Participación del médico clínico en la búsqueda de genes responsables de enfermedades.....	98
Bibliografía	99

TEMA 7. NUEVAS METODOLOGÍAS EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA: MICROARRAYS Y PROTEÓMICA

JM Vidal y R. Oliva

7.1. Nuevas metodologías y el paradigma en la investigación biomédica.	101
7.2. Transcriptómica.....	101
7.3. Proteómica.....	108
Bibliografía	113

TEMA 8. NUEVAS ESTRATEGIAS DE TRATAMIENTO: TERAPIA GÉNICA, RNA INTERFERENTE Y MEDICAMENTOS RECOMBINANTES

R. Oliva, J. Vidal

8.1. Estado actual del tratamiento de las enfermedades hereditarias.....	115
8.2. Estrategias posibles de tratamiento	115
8.3. Terapia génica	116
8.4. Vectores víricos.....	117
8.5. Vectores y métodos no víricos	120
8.6. iRNAs.....	122
8.7. Sustitución proteica y producción de proteínas recombinantes	125
8.8. Producción de anticuerpos monoclonales como fármacos	127
Bibliografía	127

TEMA 9. RESULTADOS DE LOS PROTOCOLOS DE TERAPIA GÉNICA

R. Oliva

9.1. Los primeros años de terapia génica	129
9.2. Distribución de los protocolos de terapia génica por enfermedades y categoría médica	131
9.3. Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID): ADA-SCID i X-linked SCID	131
Bibliografía	134

TEMA 10. FARMACOGENÉTICA Y FARMACOLOGÍA PERSONALIZADA

J.M. Vidal

10.1. Variabilidad en la respuesta farmacológica.....	135
10.2. Farmacogenética clínica	136
10.3. Variabilidad genética y respuesta a fármacos.....	138
10.4. Mecanismo genético en la variabilidad en la respuesta farmacológica	138

Índice	11
10.5. Genes ADME polimórficos.....	138
10.6. Receptores polimórficos.....	143
10.7. Interacciones genético-ambientales.....	144
10.8. Evolución, adaptación y diversidad genética de los enzimas metabolizadores.....	145
10.9. Farmacogenética y terapia individualizada	145
10.10. Direcciones Internet de acceso a información farmacogenética.....	147
Bibliografía	147

TEMA 11. FARMACOGENÓMICA Y EL DESARROLLO DE FÁRMACOS

J.M. Vidal

11.1. Impacto del Proyecto Genoma Humano en el desarrollo farmacéutico	149
11.2. ¿Cómo identificar nuevas dianas terapéuticas?	151
11.3. ¿Cómo desarrollar fármacos para tratar las dianas encontradas?	151
11.4. Indicaciones de la farmacogenómica.....	155
11.5. Fármacos farmacogenómicos	156
11.6. Implicaciones éticas, económicas y sociales de la farmacogenómica	157
Bibliografía	158

TEMA 12. CULTIVO DE CELULAS, DIFERENCIACIÓN IN VITRO Y CRIOPRESERVACION

R. Oliva

12.1. Cultivo de células in vitro	159
12.2. Criopreservación de células	160
12.3. Células madre y células madre embrionarias	161
Bibliografía	163

TEMA 13. TRANSGÉNICOS, KNOCKOUTS Y MODELOS DE ENFERMEDADES

R. Oliva y J. Vidal

13.1. Primeros animales transgénicos	165
13.2. Generación de animales transgénicos.....	166
13.3. Generación de animales “knock-out”	167
13.4. Ejemplos y aplicaciones de modelos animales transgénicos o “knock-out”	169
13.5. Utilización de transgénicos que expresan siRNA para la supresión de la función de genes	171
Bibliografía	172

TEMA 14. ÉTICA Y LEGISLACIÓN EN GENOMA HUMANO E INVESTIGACIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

R. Oliva

14.1 Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos.....	173
14.2 Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos	176
14.3 Proyecto de Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos	182
14.3 Código penal Español.....	186
14.4 Ley de reproducción asistida.....	187
Bibliografía	196

TEMA 15. PRÁCTICAS DE BASES DE DATOS Y DE ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE DNA EN INTERNET (PRÁCTICA 1)

J.M. Vidal, R. Oliva

15.1. Introducción a la práctica	197
15.2. Obtención de la secuencia codificante del gen	197
15.3. Identificación de secuencias similares mediante el programa BLAST.	198
15.4. Determinación de si la secuencia de cDNA obtenida codifica para una proteína.	199
15.5. Obtención de la secuencia genómica correspondiente a un clon de cDNA	200
15.6. Determinación de la estructura exónica-intrónica del gen	201
15.7. Búsqueda de splicings alternativos del gen	202

TEMA 16. PRÁCTICA DE BASES DE DATOS Y DE ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE PROTEÍNA EN INTERNET (PRACTICA 2)

J.M. Vidal, R. Oliva

16.1. Introducción	203
16.2. Obtención de datos básicos de tu proteína	203
16.3. Determinar si la secuencia de tu proteína tiene patrones proteicos conocidos o funcionales	204
16.4. Predicción de la estructura secundaria de una proteína.	205
16.5. Búsqueda de regiones de una proteína conservadas en la evolución.	208

TEMA 17. PRÁCTICA DE BUSQUEDA DE VARIANTES POLIMÓRFICAS Y DE INFORMACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES (PRÁCTICA 3)

J.M. Vidal, R. Oliva

17.1. Introducción	209
17.2. Búsqueda de variantes polimórficas de un gen	209
17.3. Observación de otra información disponible en la base de datos GENECARDS.	211

TEMA 18. PRÁCTICA DE BASES DE DATOS DE FARMACOGENÉTICA (PRÁCTICA 4)

J.M. Vidal, R. Oliva

18.1. Introducción	213
18.2. Búsqueda de la vía metabólica y de información sobre interacciones entre vías	213
18.3. Polimorfismos en genes metabolizadores de enzimas	214

TEMA 1. GENOMA HUMANO Y ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LOS GENES

R. Oliva

1.1. Composición del genoma humano

La palabra "genoma" contiene la raíz Griega "gen" que significa origen, y la extensión también griega "oma" empleada en sustantivos del vocabulario biológico y médico (Winkler, 1920; Rieger et al., 1991; Riera, 1992). El término "gen" aplicado a la herencia fue acuñado por Johansen en 1909 (Carlson, 1991) para designar a las unidades de herencia asociadas a un carácter transmisible específico. Previamente los genes habían sido designados como "elementos" por Mendel (1866), "gemmules" por Darwin (1868), "pangenes" por De Vries (1889), "unidades fisiológicas" por Spencer (1864), o simplemente "carácter unidad", "factor unidad" o "factor". El concepto de "gen" ha ido cambiando a medida que ha avanzado el estado de su conocimiento (Carlson, 1991). Una de las definiciones actuales más amplia de gen sería "secuencia de información que produce un producto funcional" (Carlson, 1991). Normalmente se sobreentiende por gen a una secuencia de DNA con todos sus elementos reguladores de la transcripción que da lugar a una proteína o a un RNA. "Genoma" puede definirse como el contenido total de material genético característico de una especie (Oliva, 1986; Cummings, 1995; Thompson et al., 1996; Oriola y Oliva, 2001). También se utiliza para indicar el material genético presente en virus.

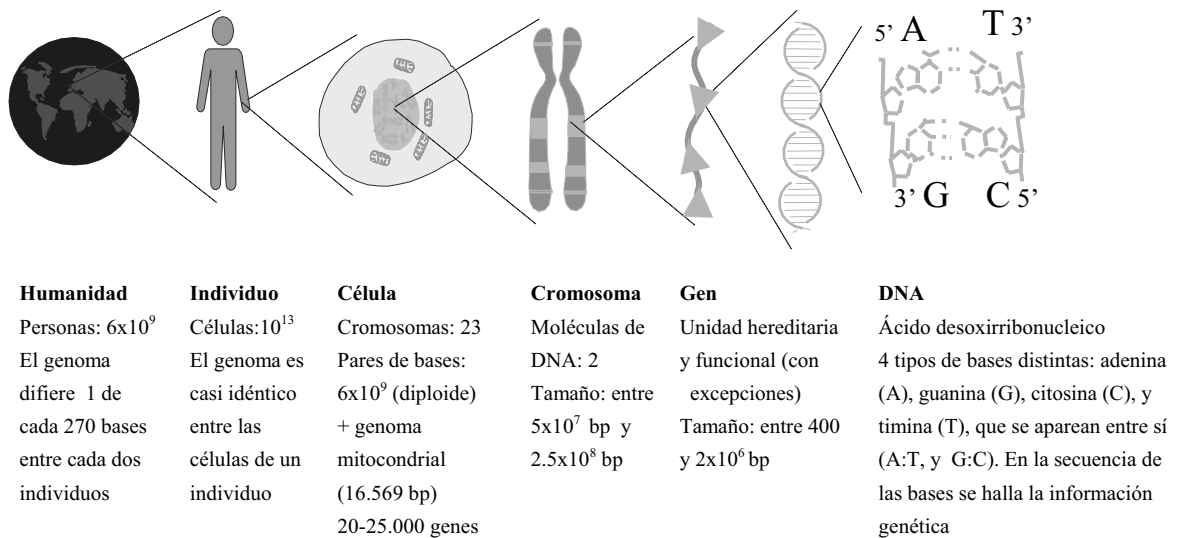


Figura 1.1. Niveles a los que puede considerarse el genoma humano. El genoma es el material genético característico de la especie humana por lo que debe de considerarse la variación existente entre los distintos individuos. Modificado de Oliva (1996).

Al nivel más elemental de todos el Genoma Humano está compuesto por cuatro tipos distintos de bases: (A) adenina, (T) timina, (C) citosina y (G) guanina (Fig. 1.1; Levene, 1917; Watson and Crick, 1953). Estas bases se unen entre sí para formar 23 secuencias lineales continuas (con un total de 3.000 millones de bases) y una secuencia circular de 16.569 bases (cromosoma mitocondrial). Dado que las bases son complementarias dos a dos (T:A, y C:G), cada hebra de DNA viene apareada con otra hebra complementaria. Ambas hebras se enrollan formando la estructura típica de doble hélice (Fig. 1.1; Watson

and Crick, 1953). Es precisamente en la secuencia de bases de estas moléculas de DNA contenida en los cromosomas que componen el Genoma Humano en donde se halla la información necesaria (genes) para determinar todas las características con base hereditaria del ser humano (Fig. 1.1). Las moléculas de DNA se organizan en forma de cromosomas. El núcleo de una célula diploide contiene 23 pares de moléculas de DNA.

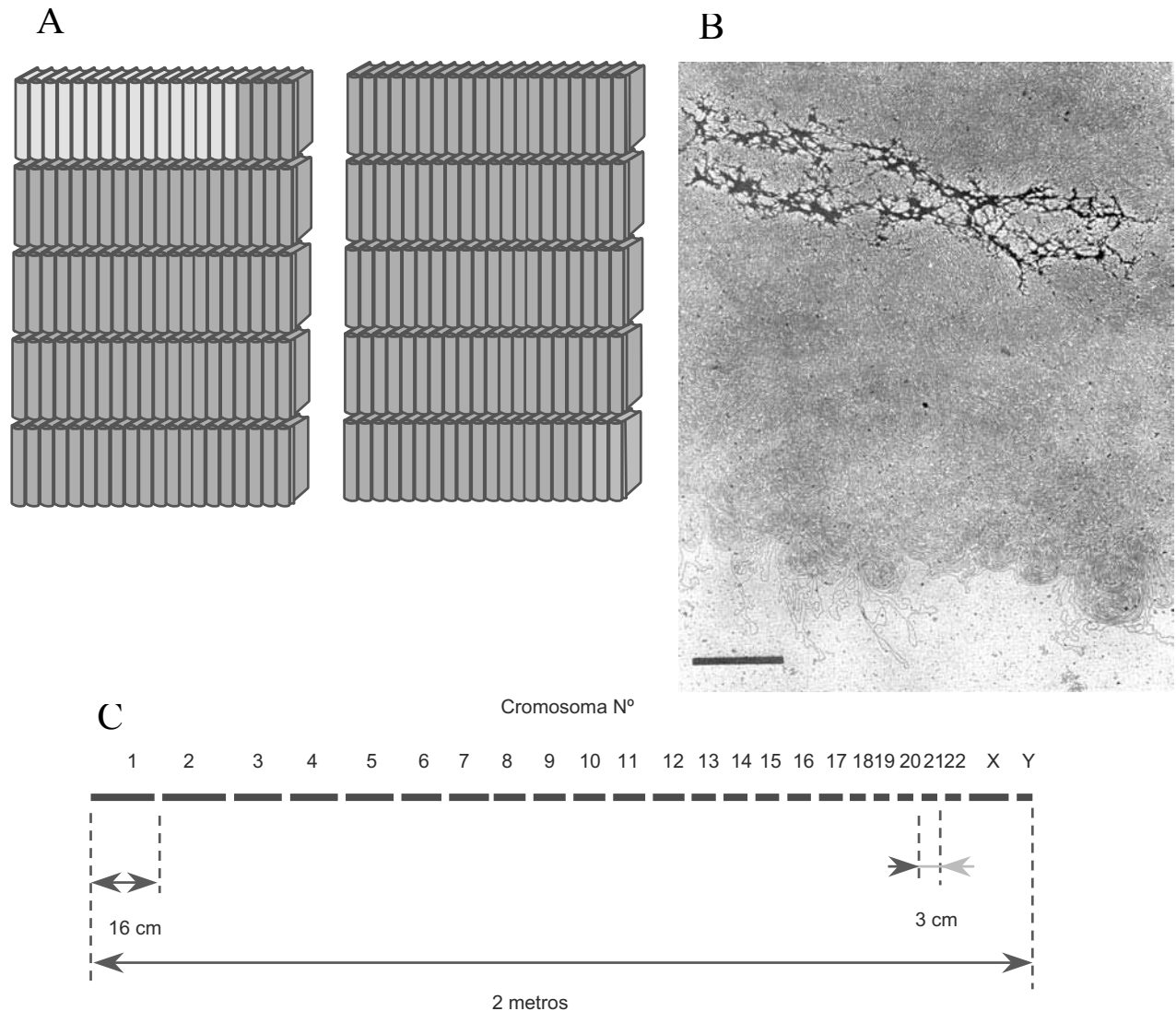


Figura 1.2. Ejemplos sobre la información contenida en el genoma y su tamaño físico. La secuencia del genoma de 1 célula requiere para poder ser escrita 200 volúmenes de 100 páginas cada uno (A). Actualmente la secuencia del genoma es consultable gratuitamente online por cualquier persona. B: Fotomicrografía electrónica de parte de un cromosoma humano al que se le han quitado las histonas permitiendo el desempaquetamiento y visualización de la molécula de DNA C: Dimensiones reales de las moléculas de DNA de una célula diploide humana. Modificado de Oliva (1996).

Normalmente es a este nivel celular de 23 pares de cromosomas más el cromosoma mitocondrial al que se suele considerar el Genoma Humano. Pero el Genoma Humano puede considerarse también a niveles superiores. La secuencia de las moléculas de DNA de las distintas células que componen el organismo humano no es siempre la misma, sino que en ciertas células y en ciertas regiones de los cromosomas se dan reorganizaciones de la secuencia de DNA con una función fisiológica. Por ejemplo la enorme diversidad de anticuerpos presentes en el ser humano se consigue gracias a este tipo de

reorganización fisiológica durante el desarrollo del sistema inmunitario. También durante la meiosis se produce un intercambio de material genético entre distintos cromosomas homólogos. El nivel superior al que puede ser considerado el Genoma Humano es al nivel de toda la humanidad. Cada dos individuos de la especie humana difieren entre sí aproximadamente un 0.1%. Para conocer la verdadera magnitud del Genoma Humano hay que considerar el número total de individuos en la tierra (6×10^9) y tener en cuenta esta variabilidad. Un catálogo que incluyera todas las diferencias de secuencia de DNA requeriría 15×10^{15} entradas. Un catálogo de estas características podría resultar necesario en un futuro para conocer las enfermedades genéticas más raras o más complejas.

	Genoma Nuclear	Genoma mitocondrial
Tamaño	3.000.000 Kb	16,5 Kb
Número de moléculas distintas	23 en las mujeres 24 en el hombre	1
Número de copias por célula diploide	2	> 1000
Tipo de DNA	Lineal	Circular
Presencia de nucleosomas	Sí	No
Número de genes	35.000 aprox.	37
Densidad génica	1 gen cada 30-60 Kb	1 gen cada 0,45 Kb
DNA codificante	2%	95%
Presencia de intrones en los genes	Sí	No
Secuencias repetitivas	20%	<1%
Recombinación	>1 por cromosoma y meiosis	No
Herencia	Mendeliana	Exclusivamente por vía

Tabla 1.1. Diferencias fundamentales entre el genoma nuclear y el genoma mitocondrial. A parte de las diferencias indicadas, en el genoma mitocondrial puede darse el fenómeno de heteroplasmia consistente en la existencia de distintas secuencias o variantes dentro de una misma célula, o en células distintas de un mismo individuo.

Numéricamente, el Genoma Humano, sin tener en cuenta la variabilidad entre individuos de la especie humana, es de aproximadamente 3×10^9 bases. A fin de entender mejor qué significa esta cifra resulta útil establecer algunas comparaciones:

1) Si tuviésemos que escribir la secuencia entera del DNA de una célula podríamos llenar 200 guías de teléfono de Barcelona (1000 páginas cada tomo).

2) Otra suposición útil para comprender mejor la magnitud del Genoma Humano es considerar las dimensiones lineales que tendrían los cromosomas de una sola célula si pudiésemos estirarlos sin romperlos y disponerlos uno a continuación del otro. La respuesta sería 2 metros (el cromosoma más pequeño (21) mediría 3 cm, y el más grande (1) mediría 16 cm).

3) La complejidad del Genoma Humano queda muy de manifiesto al observar por microscopía electrónica lo que ocurre si se quitan las proteínas que normalmente empaquetan a un cromosoma metafásico (Figs. 1.2B y 5.2; Paulson and Laemmli, 1977) y observar a través de microscopía electrónica toda la maraña de cadenas de DNA que protuyen de los restos del esqueleto cromosómico.