

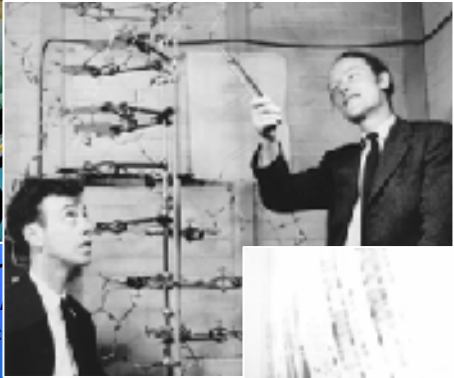
Estudio del Genoma, Transcriptoma y Proteoma a través de *arrays*

DEL MONJE MENDEL AL EMPRESARIO VENTER (1865/2000) Cronología de una investigación histórica

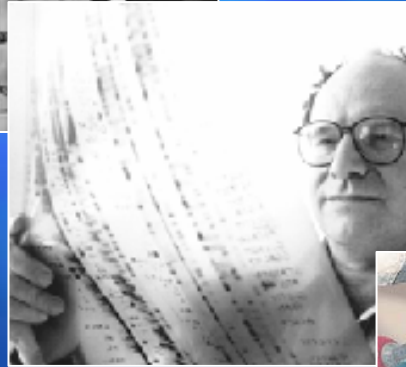


Werner Horvath
Mendel: The Pea-
Genetic

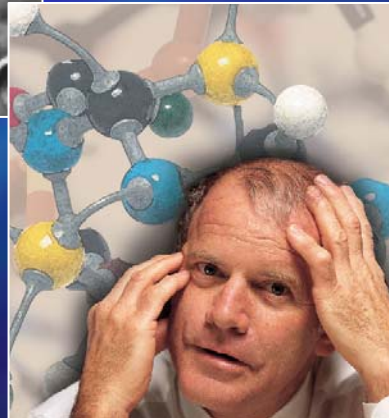
1865 - El monje agustino austríaco Gregor Mendel demuestra las leyes de la herencia, pero su descubrimiento pasa desapercibido.



1953 James Watson y Francis Crick desentrañaron la estructura en doble hélice de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN).



1977 Allan Maxam y Walter Gilbert en Harvard University y Frederick Sanger en U.K. Medical Research Council (MRC) independientemente desarrollan métodos de secuenciación del ADN



1985 Kary Mullis inventa la reacción en cadena de la polimerasa.

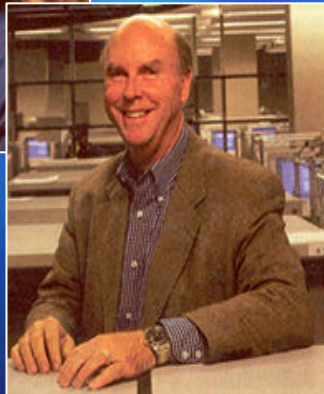
DEL MONJE MENDEL AL EMPRESARIO VENTER (1865/2000) Cronología de una investigación histórica



1990 el proyecto genoma humano se convirtió en una realidad gracias al presupuesto del gobierno estadounidense y a donaciones del Wellcome Trust de Gran Bretaña.



2000 El consorcio liderado por *Francis Collins* ha conseguido descifrar hasta el 97 por ciento del genoma humano, del cual el 85 por ciento se ha secuenciado de manera precisa.



2000 Craig Venter, presidente de la empresa PE Celera Genomics, anuncio de haber completado la secuencia, primera fase de todo el proyecto. En sólo siete meses, Venter ha tomado la delantera a diez años de trabajo del gigantesco proyecto público y ha logrado una lectura completa de los 3.000 millones de letras químicas que contienen las instrucciones para fabricar una persona

Por qué secuenciar el genoma humano?

HGP



Hierarchical
Shotgun

Science 291 (2001) 1304-1351

CELERA



Whole-genome
shotgun

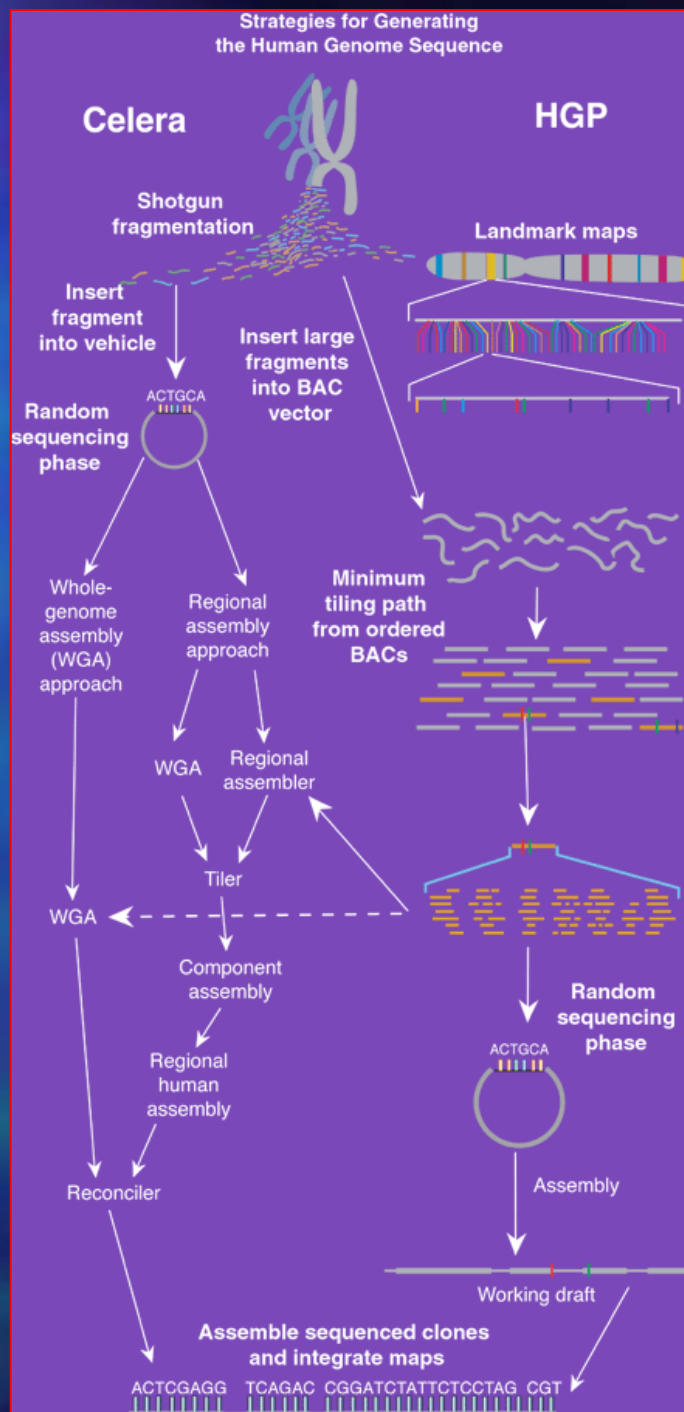
Nature 409 (2001) 860-921

Las 2.9×10^9 bases del genoma humano se encuentran disponibles para todo publico en internet:

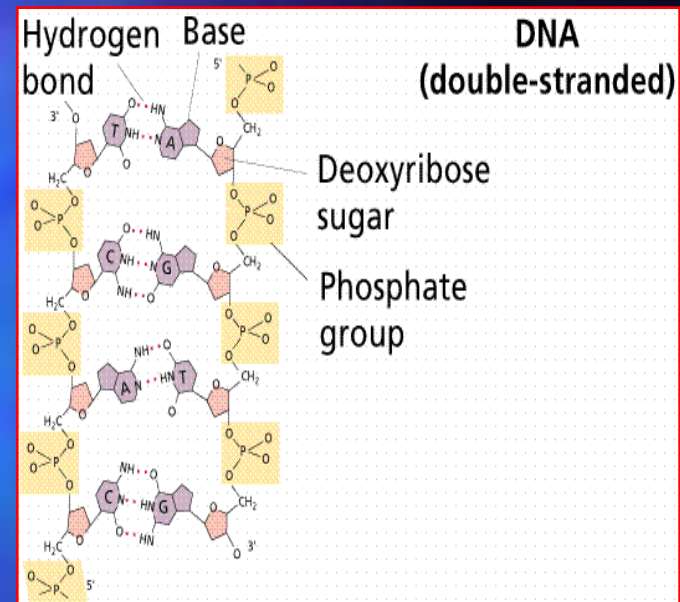
<http://www.ensembl.org>

<http://public.celera.com/cds/login.cfm>

14/05/2008



GENES



- Un gen desde el punto de vista molecular es una secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN en el caso de algunos virus), que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica. Por ejemplo: Proteínas, ARNm, ARN ribosómico, ARN de transferencia y ARN pequeños.
- Desde el punto de vista genético un gen es considerado como la unidad de almacenamiento de información y unidad de herencia, al transmitir esa información a la descendencia.

GENOMA HUMANO

- El Genoma es todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular. Por lo general, al hablar de genoma en los seres eucarióticos nos referimos sólo al ADN contenido en el núcleo, organizado en cromosomas. Pero no debemos olvidar que también la mitocondria contiene genes (genoma mitocondrial).
- Cuando el primer borrador de la secuencia completa del genoma humano fue publicado en el año 2001, se estimó que el número de genes codificantes proteínas era alrededor de 30.000 – 40.000.
- Sucesivamente en el año 2004 se completó el proceso de anotación del genoma y el valor fue ajustado a 20.000 - 25.000 secuencias codificantes.

Tamaño de algunos tipos de genómas

Organismo Tamaño Genoma

Fago λ	5×10^4
Escherichia coli	4×10^6
Levadura	2×10^7
Caenorhabditis elegans	8×10^7
Drosophila melanogaster	2×10^8
Humano	3×10^9



Mecanismos localizados en el genoma que contribuyen a la variabilidad génica

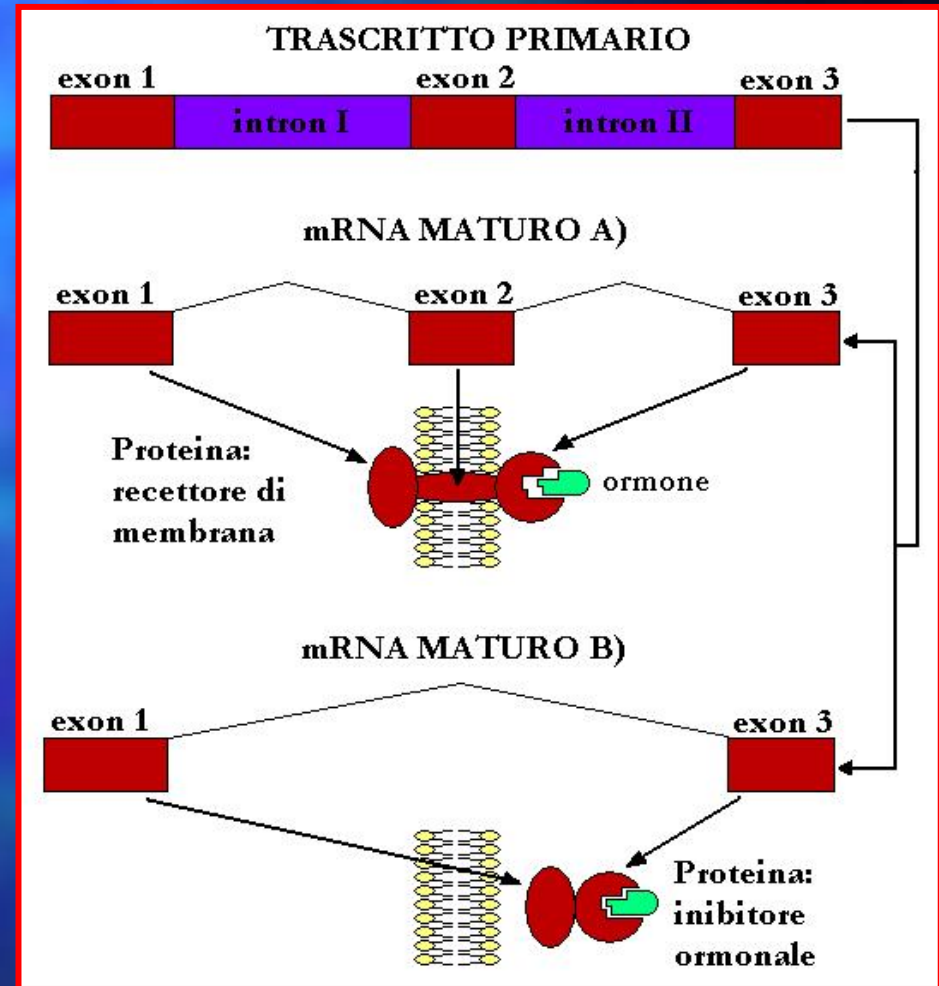
- los polimorfismos génicos
- las variaciones en el número de copias

TRANSCRIPTOMA HUMANO

- Mientras que se habla del genoma humano, este epíteto no tiene sentido para el transcriptoma humano.
- Por eso es importante estudiar qué porción del genóma es transcrito a RNA mensajero
- El concepto de transcriptoma surge para representar todo este mRNA transcrito bajo unas circunstancias, de forma global.
- La transcriptómica permite cuantificar el nivel de expresión de genes, empleando técnicas basadas en micromatrices.

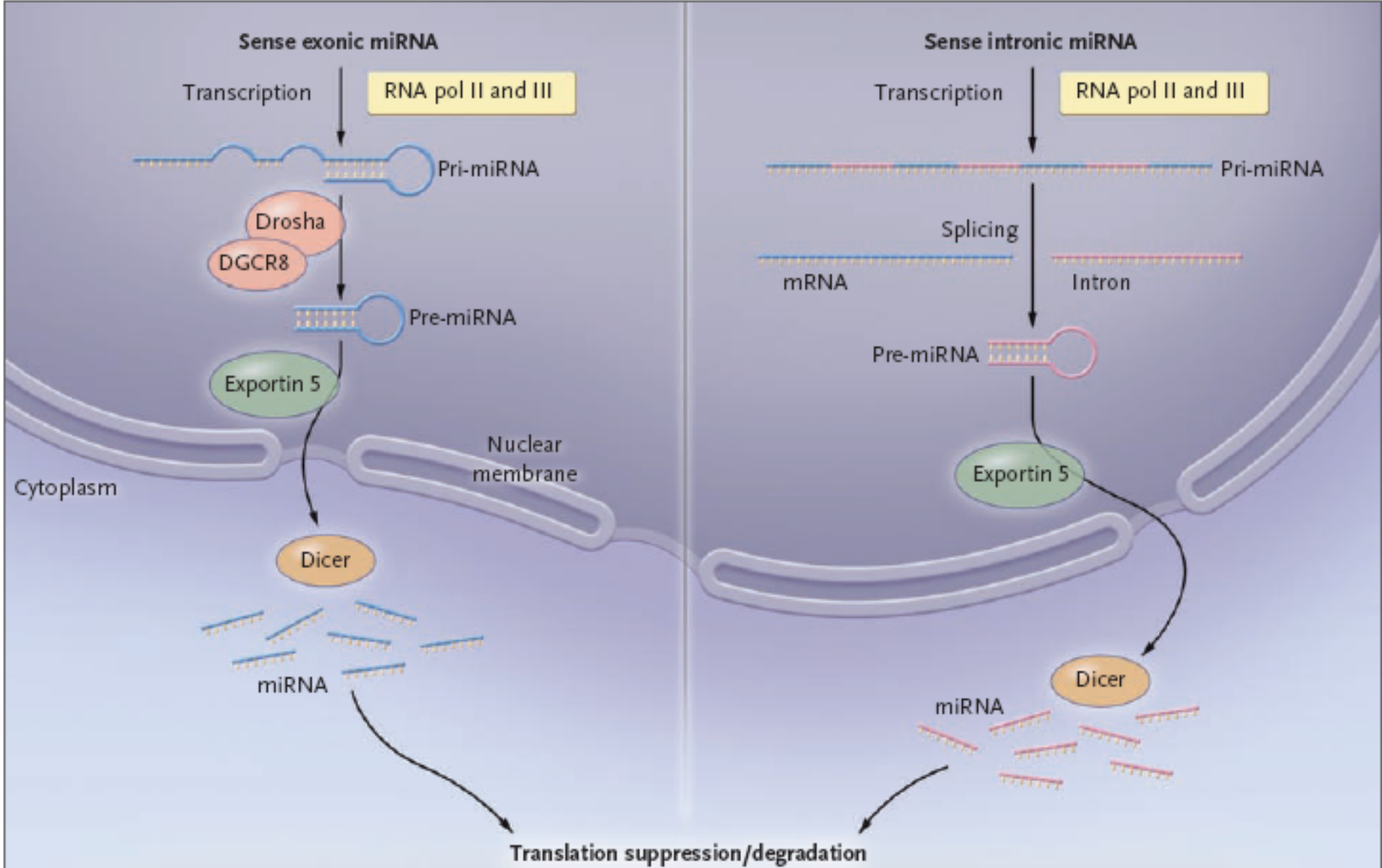
Splicing y Splicing alternativo

- El termino *splicing* (soldadura) indica, uno de los procesos, que junto al *capping* y a la poliadenilación, llevan a la maduración de los transcriptos primarios de genes.
- Se calcula que cada gen humano pueda originar en promedio 4 diferentes transcriptos.



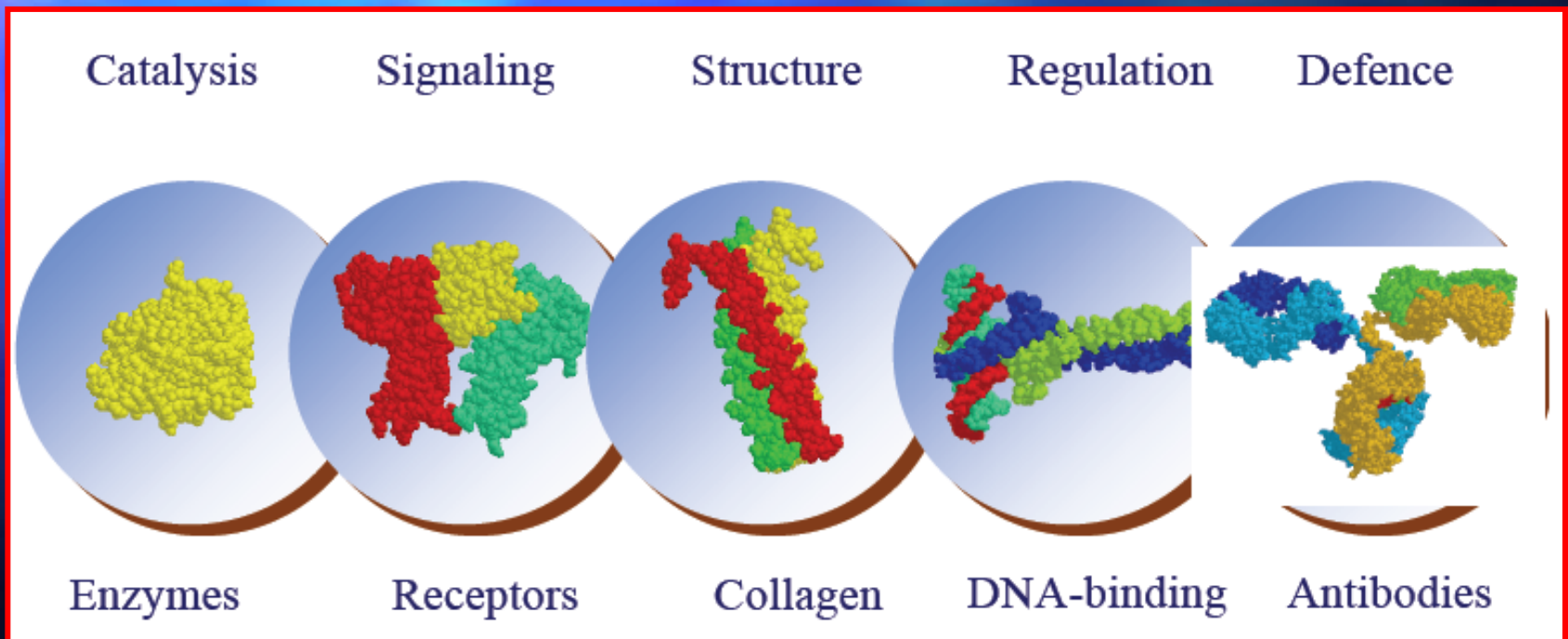
Transcripción de los genes no codificantes

- Solo nos vamos a ocupar de lo que ocurre en el grupo de genes cuyo producto final son pequeñas moléculas de ARN de unos 20 nucleótidos.
 - microARN (miRNA) (endogenous)
 - ARN de interferencia (siRNA) (exogenous)
 - tasiRNAs, rasiRNAs, scnRNAs, piRNAs (endogenous siRNA)



Proteomics in Genomeland

- La complejidad de la biología humana se puede explicar considerando que los procesos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales generan un aumento en el número de proteínas de algunos ordenes de magnitud con respecto al número de genes.



PROTEOMA HUMANO

- Conocer el proteoma de un organismo es tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas por ese organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente.
- La proteómica puede definirse como la genómica funcional a nivel de proteínas.
- Es la ciencia que correlaciona las proteínas con sus genes, estudia el conjunto completo de proteínas que se pueden obtener de un genoma.

Modificaciones Post-traduccionales

- Fosforilación (el genoma humano se estima que produce alrededor de 500 protein kinasas - *Kinome*)
- Clivaje proteolitico (el genoma humano se estima que produce alrededor de 560 proteasas – *Degradome* - que a su vez pueden generar las neo-proteínas cripticas)
- Glicosilación (la mitad de las proteínas conocidas son potencialmente glicosilada – *Glicome*)

Localización subcelular (*Localizome*)

- La célula eucariótica es altamente compartimentalizada por lo tanto la función de una proteína es altamente correlacionada con su localización.
- El desarrollo de metodologías que permiten sistemáticamente marcar proteínas a partir de bibliotecas de cDNA en combinación con técnicas de *screening* visual por microscopia, ha permitido el estudio del *Localizoma*.

Expresión tejido específica

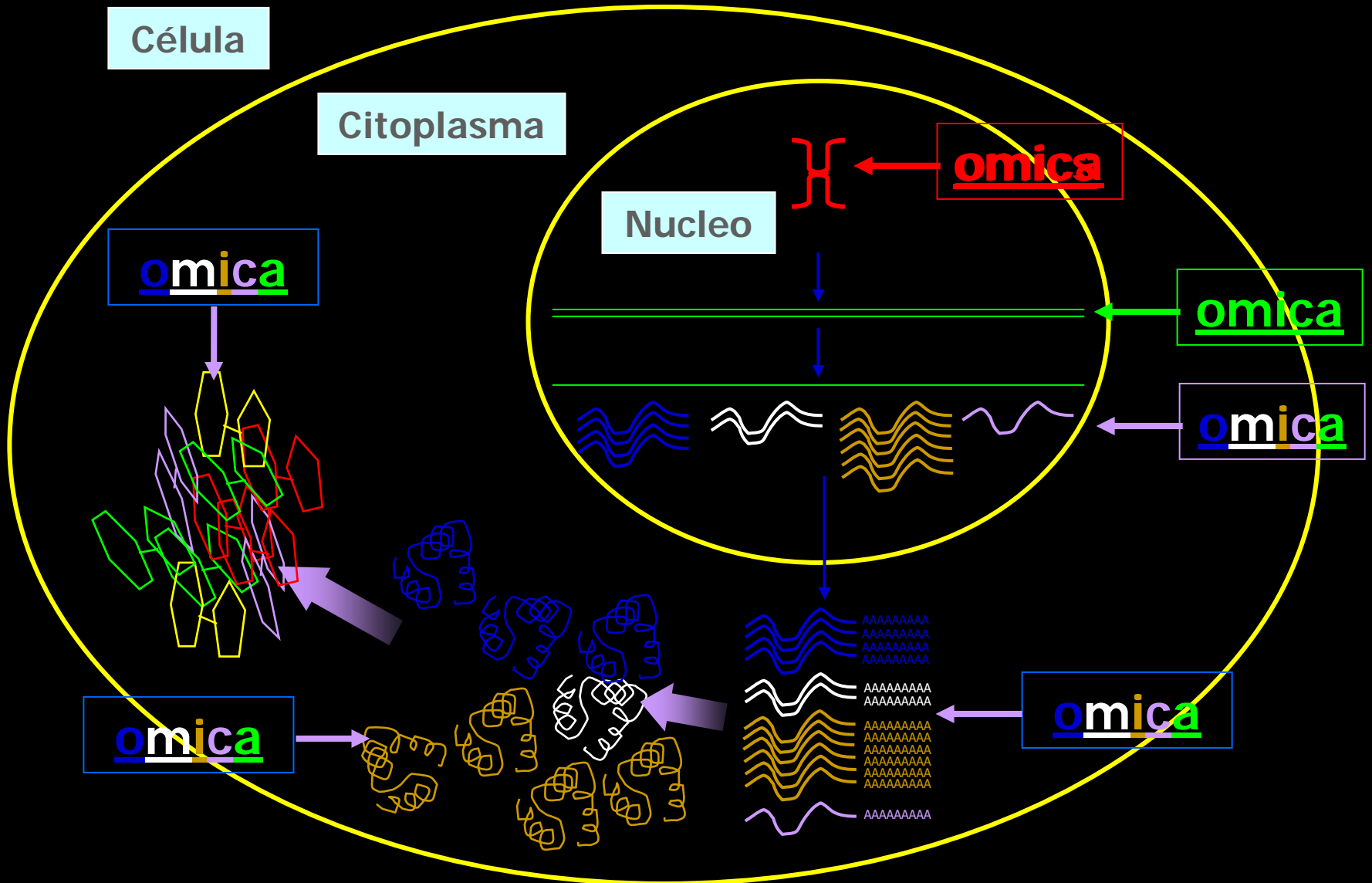
- El estudio de la expresión de las proteínas a nivel de tejido requiere la selección de anticuerpos específicos por cada proteína de interés.
- *Atlas of protein expression*
 - Wellcome Trust Sanger Institute (Phage Display Technology *scFv*)
 - Swedish Human Protein Atlas – HPA (Monospecific Antibodies *msAbs*)

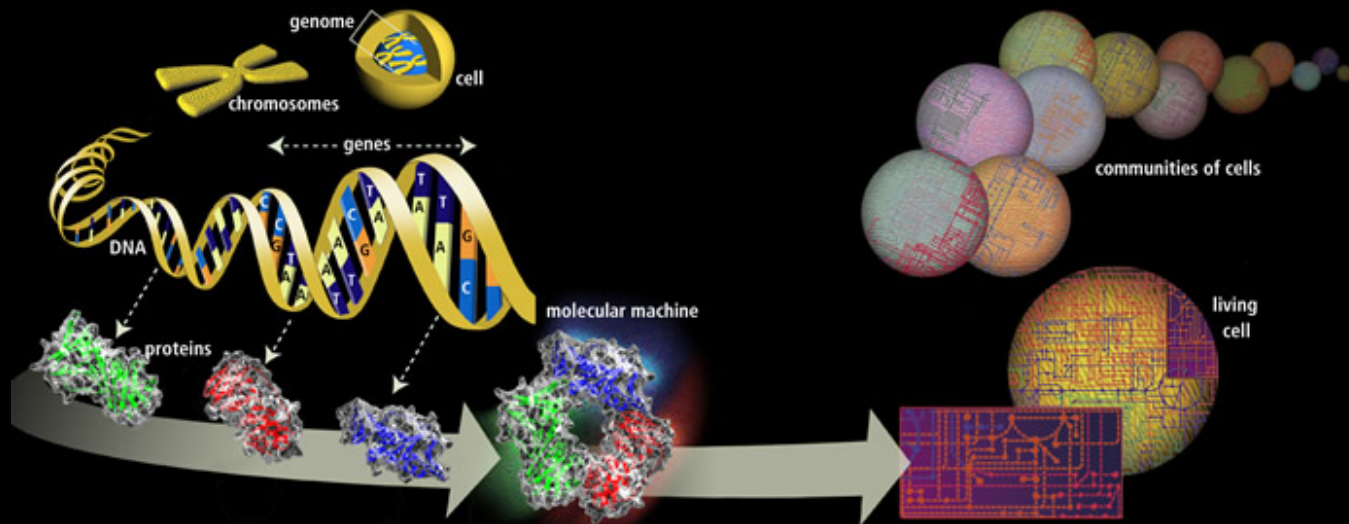
"Omics" and "Omes" era

- Tanto el termino "*omics*" como "*omes*" han sido adoptados por los biologos moleculares y los bioinformaticos para indicar aquellas disciplinas y metodología de nueva istitución.
- Las tecnologías "*omics*" respresentan herramientas útiles para tratar de definir la función de todos los génes del genóma humano y los productos correspondientes en un solo experimento.
- La integración de los datos provenientes de los diferentes abordajes "*omics*" permitirá comprender como las células los tejidos y los organismos cumplen sus funciones.



Array de "omicas"

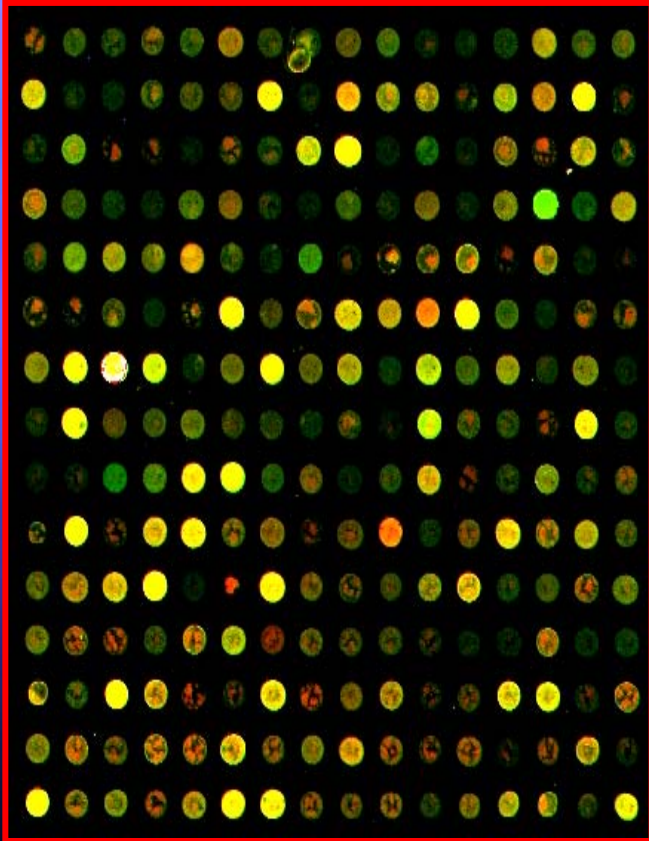




Cual es el objetivo de las omicas?

Estudiar y caracterizar la función biológica en el contexto de un sistema biológico

Definición de *microarray* o *biochip*



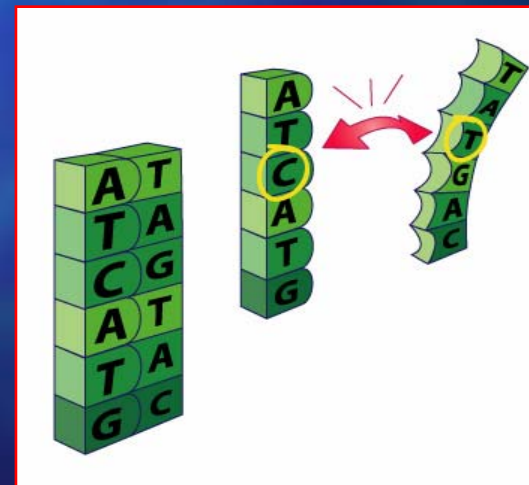
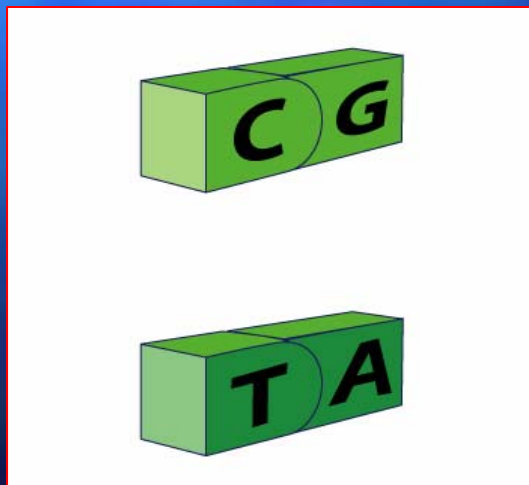
Los *microarrays* (micromatrices o microarreglos) representan una herramienta esencial para los estudios de omica, que permiten los análisis cualitativo y cuantitativo, en forma simultánea, masiva y miniaturizada, de genes y/o productos genicos.

Science 270: 467-483 (1995)

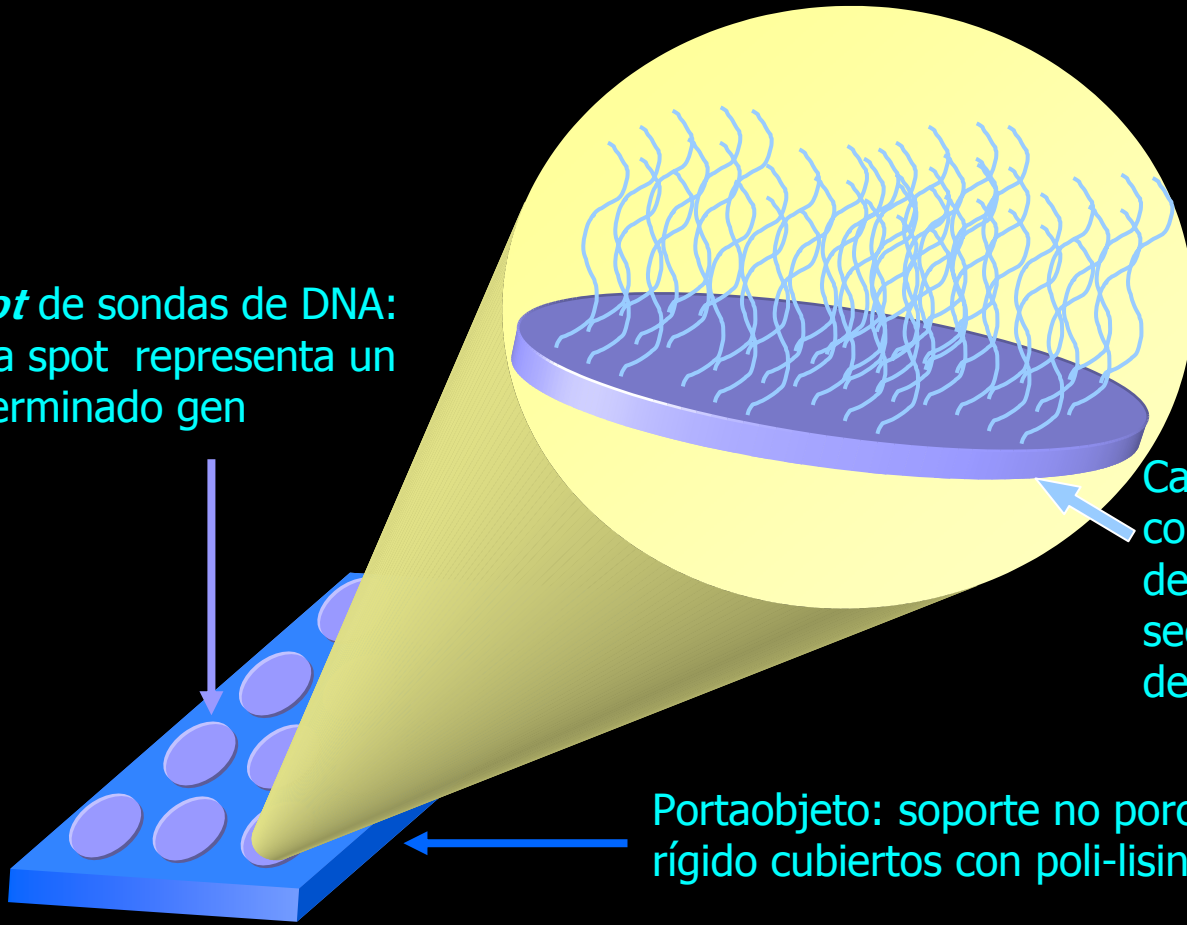
Noción General

La detección de los ácidos nucleicos con microarray, sea DNA o RNA, es llevada a cabo por medio de dos características físico-químicas fundamentales:

- La complementariedad de bases nitrogenadas
- La formación de secuencias duplex a través de puentes hidrógeno



Spot de sondas de DNA:
cada spot representa un
determinado gen



Cada **spot** del ordenamiento esta
compuesto por multiples copias
del mismo oligonucleótido, cuya
secuencia es especifica por un
determinado gen

Portaobjeto: soporte no poroso impermeable y
rígido cubiertos con poli-lisina

TIPOS DE MICROARRAYS de ADN

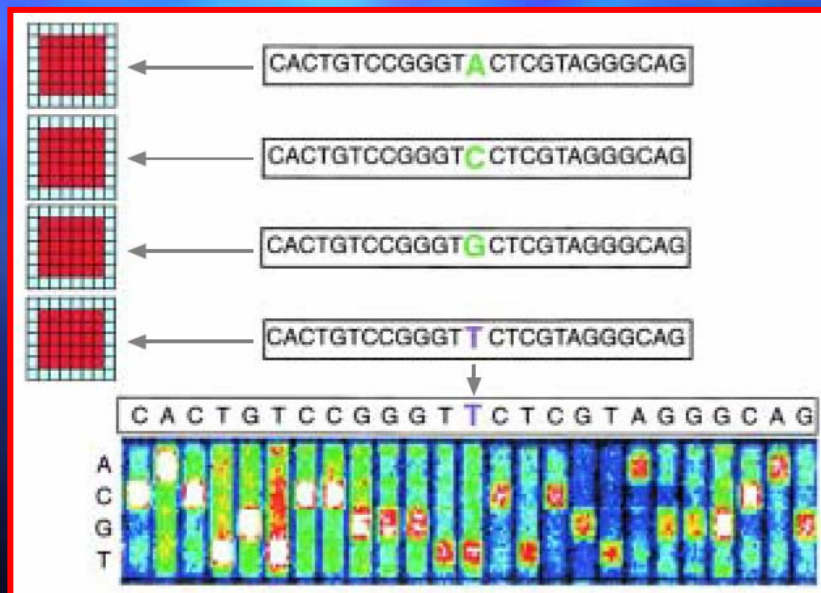
- Microarrays en portaobjetos
- Gene-Chip
- Chips microelectrónicos

Estudios de ADN con *arrays*

- Genotipado de SNPs
- Regulación génica
- Hibridación Genómica Comparada

Resecuenciación mediante *microarrays* de ADN

- La resecuenciación es una de las últimas aplicaciones de los microarrays de ADN, que permite la identificación de mutaciones y SNPs a partir de una secuencia conocida.
- Menos del 0,1% del genoma humano presenta variaciones entre distintos individuos siendo las formas más frecuentes de variaciones los SNPs o polimorfismos de una sola base.

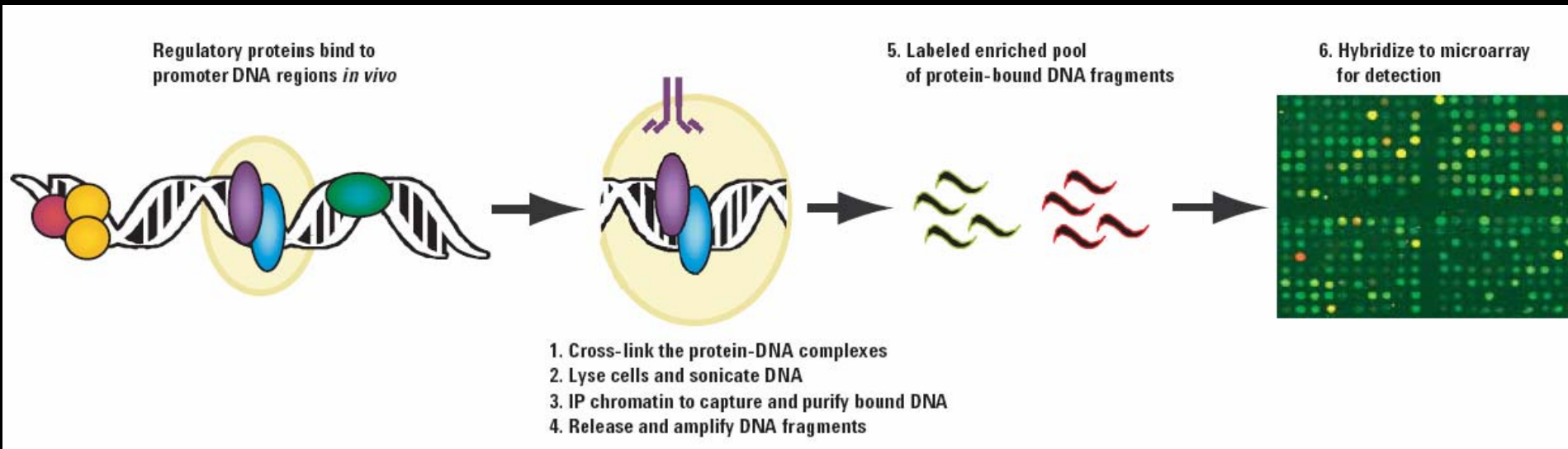


CodeLink p450 SNP Bioarrays

Estudio de la regulación genica mediante *microarrays* de ADN

- Estudio de regulación de la expresión genica (factores de transcripción específicos, metilación de las islas CpG, acetilación de histonas).

Where the proteome meets the genome



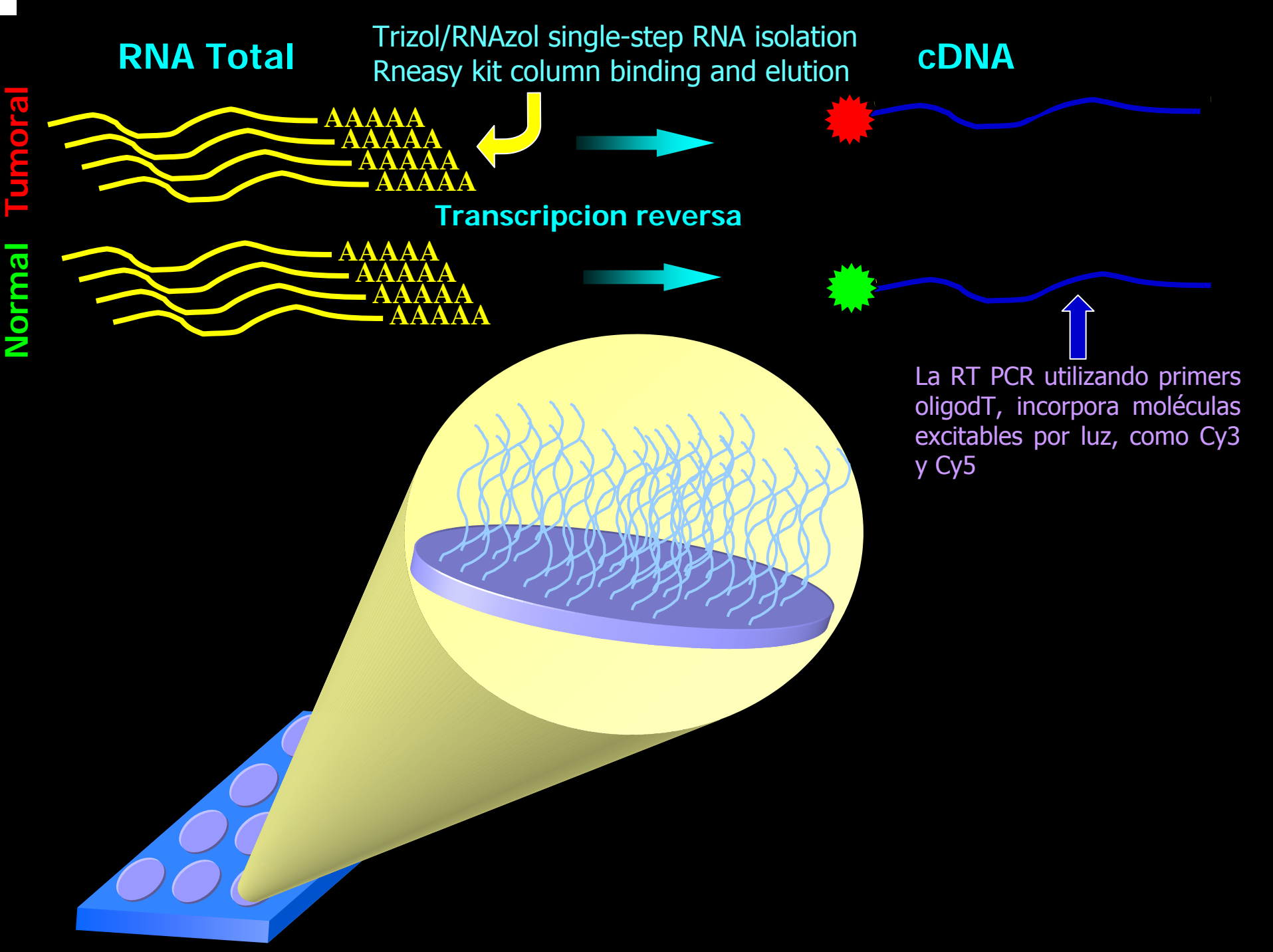
- Región promotora de los genes (500 bp o *enhancer* a 20 kb)
- Programas específicos permiten determinar la secuencia del promotor de cada gen
 - Transcription Regulatory Regions Database (TRRD)
<http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/dbases/trrd4/trrdintro.htm>

Hibridación genómica comparada con *microarray* de ADN

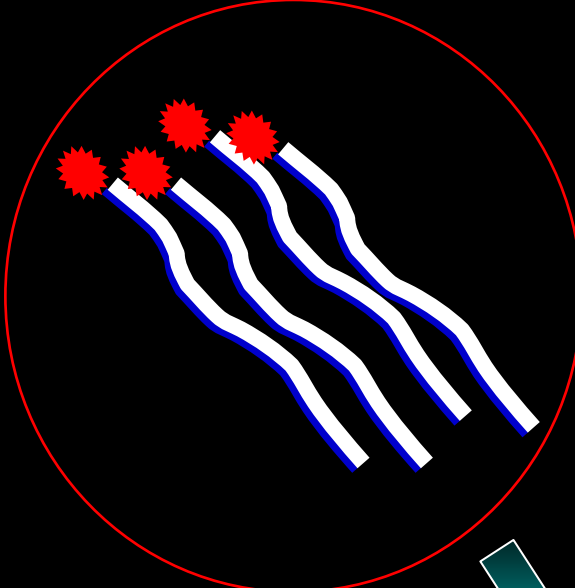
- Es un método citogenético molecular que permite monitorear anomalías cromosómicas. Las alteraciones se clasifican en pérdidas, ganancias y amplificaciones de DNA, incluyendo mutaciones a nivel de cromosomas completos y por loci.
- Permite monitorear tumores y defectos congénitos a partir de cromosomas en metafase o DNA genómico.
- La técnica se basa en la hibridización competitiva donde se colorea el DNA tumoral con un marcador fluorescente y el DNA blanco con otro.
- Permite el estudio de material de archivo como muestras congeladas o embebidas en parafina con el fin de correlacionar la evolución clínica con aberraciones cromosómicas.

Estudios de ARN con *arrays*

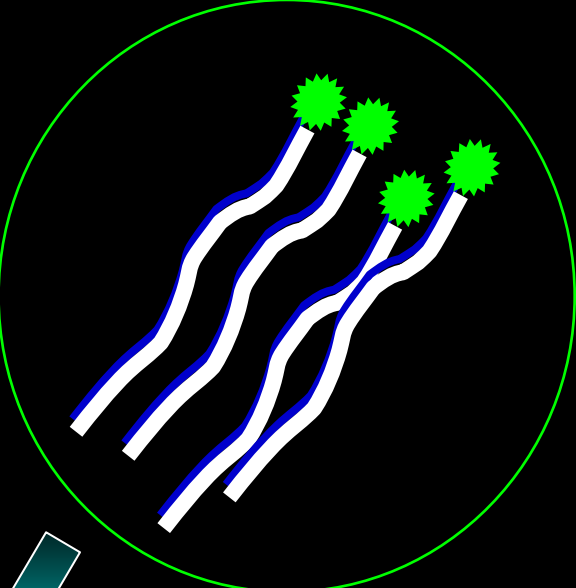
- La expresión genica es el proceso por medio del cual la información codificada en el ADN se transforma en las proteínas necesarias para el desarrollo y funcionamiento de la célula.
- El perfil de expresión génica de una célula proporciona información sobre su fenotipo y su respuesta al medio
- Los *microarrays* de RNA permiten la determinación del perfil de expresión, es decir la cuantificación relativa de los ARN transcriptos, mediante la comparación de los ARNm aislados de dos muestras diferentes.



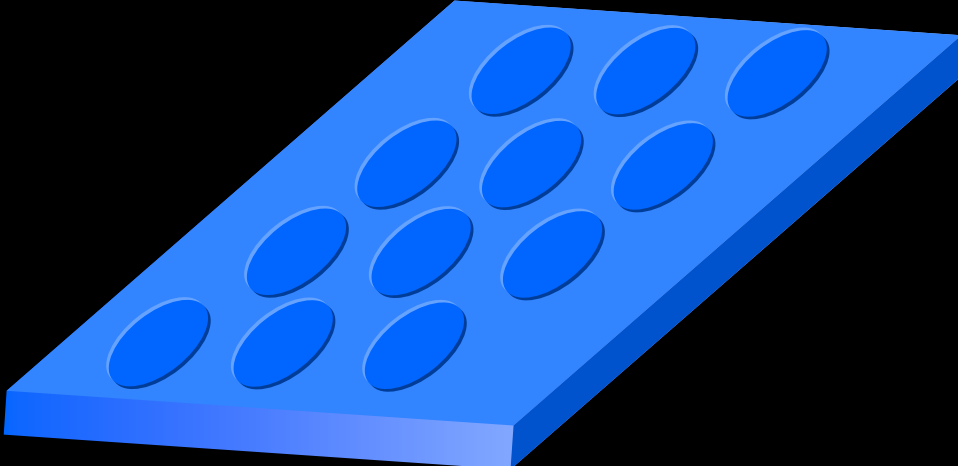
Los cDNAs marcados con diferentes fluoróforos son co-hibridizados sobre un solo soporte de sondas

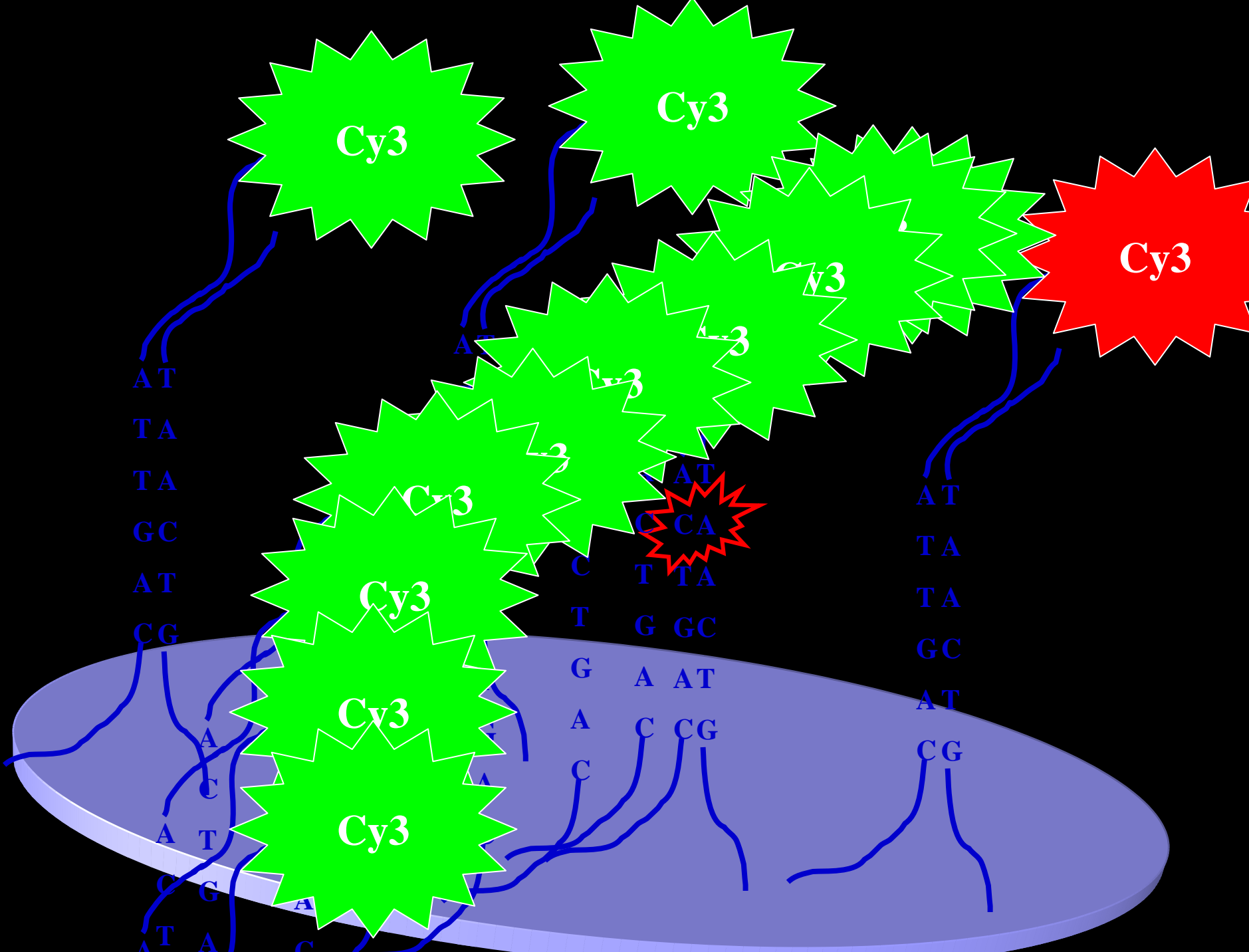


cDNA marcado con Cy5

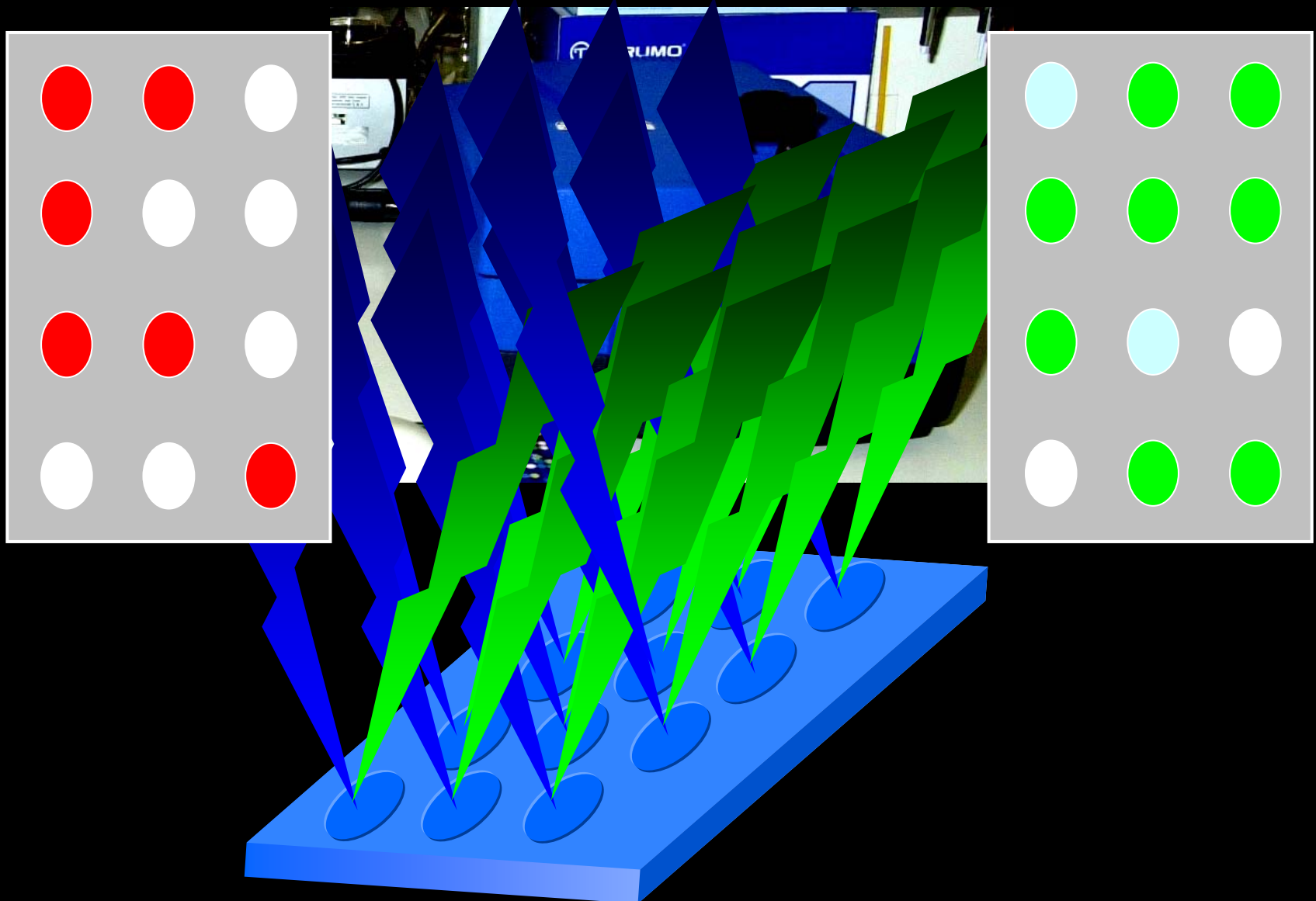


cDNA marcado con Cy3





Adquisición de las imágenes: la cuantificación relativa, se realiza por medio de equipos de barrido de imágenes con dos láseres de excitación



Diseño experimental

- El diseño experimental es esencial en los experimentos de microarrays y es crucial desde la recolección de muestras y criterios de inclusión, la elección del microarray a ensayar y el método para inferir los resultados.

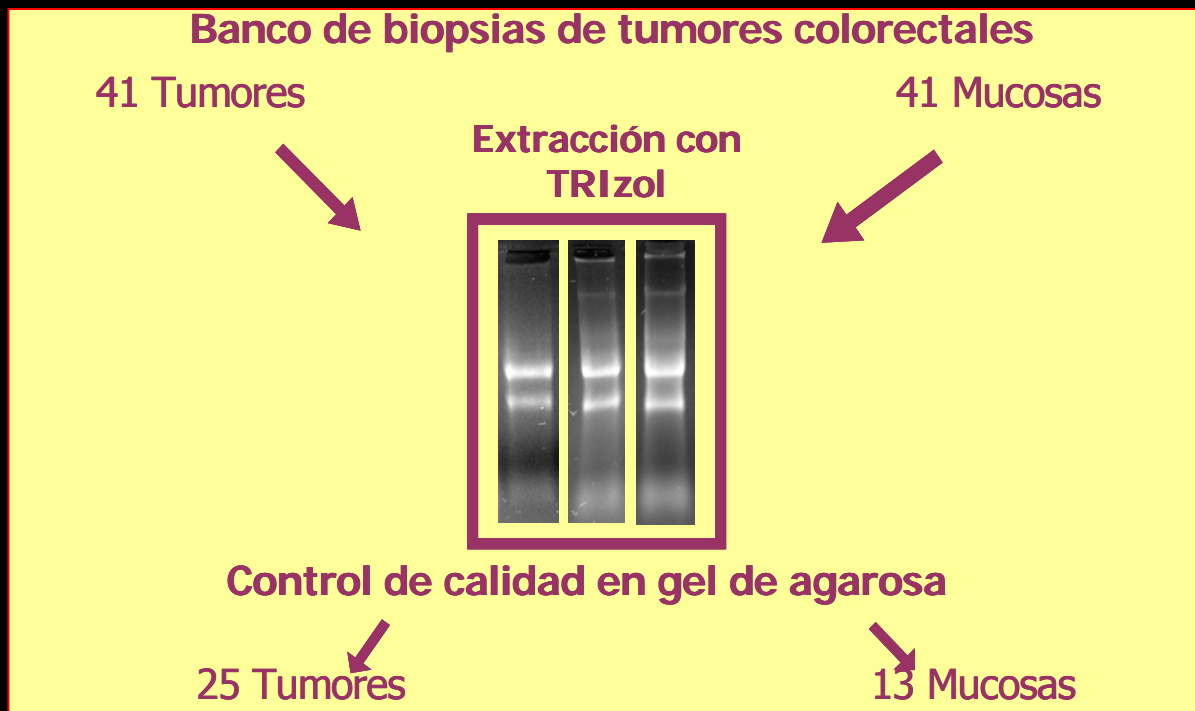
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TUMORES COLORECTALES HUMANOS POR MEDIO DE MICROARRAYS DE cDNA

En nuestro estudio comparamos los perfiles de expresión de tejidos colorectales “*enteros*” y de la mucosa adyacente *no-cancerosa* a partir de resecciones quirúrgicas, con el propósito de:

- 1) entender mejor los mecanismos genéticos de la oncogénesis en los tumores de colon humano.
- 2) identificar nuevos potenciales marcadores de utilidad para la práctica clínica

Muestras de CCR

- Un total de 82 tejidos tumorales y sus mucosas adyacentes correspondientes, se obtuvieron de 41 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma colorectal esporádico.
- Cada espécimen extraído se evaluó en relación a su contenido de células tumorales, mediante la tinción con hematoxilina-eosina. Solo se incluyeron en este análisis, aquellos tejidos que contenían más de un 75% de células tumorales.
- Las muestras fueron conservadas a -80° C para su posterior análisis molecular.

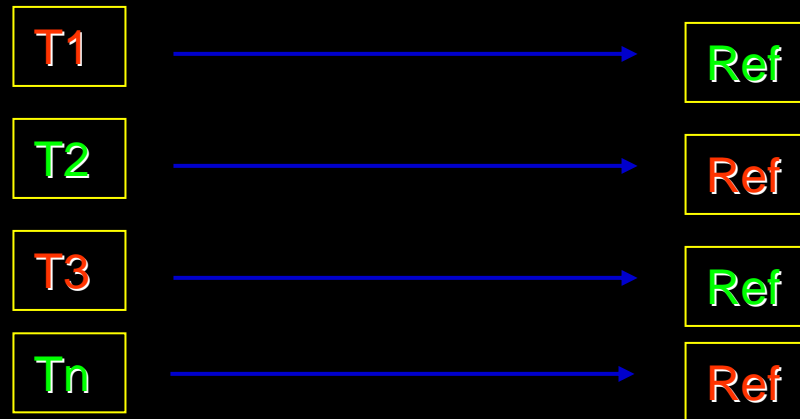


Pacientes

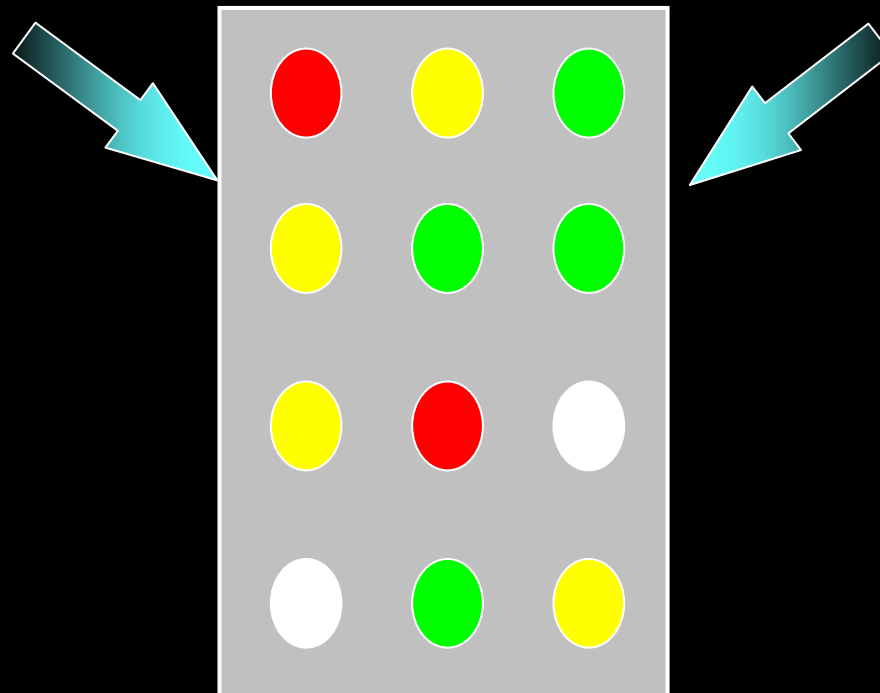
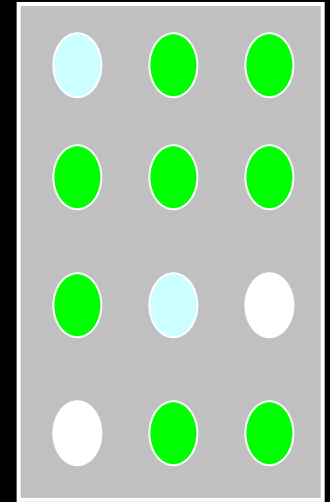
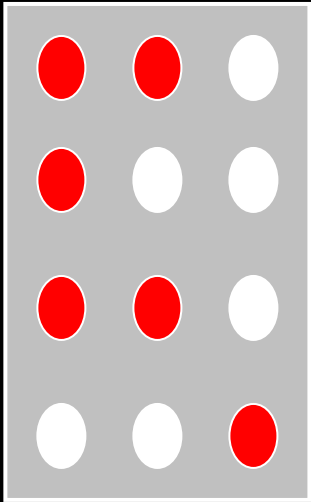
- Solamente fueron incluidos en el ensayo 38 muestras de nuestro banco (25 tumores y 13 mucosas normales) que presentaron alta calidad de RNA.
- Las muestras normales fueron agrupadas en cantidades equimolares para generar un único *standard* de referencia, que se usó como control en todas las cohibridizaciones sobre los microarrays.

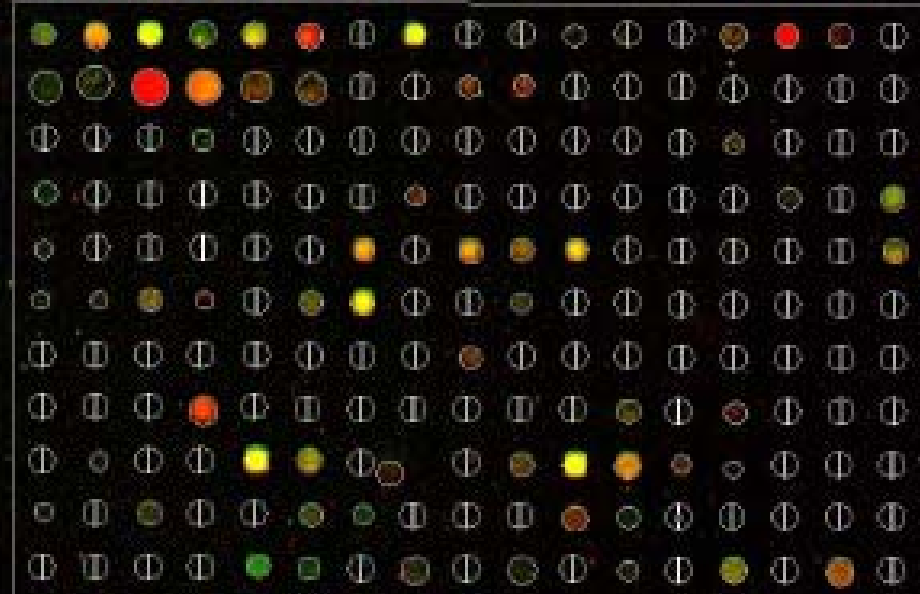
n = 25 tumores

Pool de referencia = 13 mucosas



Las lectoras de microarrays producen imágenes compuestas por una matriz de *píxels*, donde cada uno de ellos representa la intensidad de fluorescencia de una pequeña área proveniente de la muestra





Los resultados primarios o datos crudos (valores primarios de las emisiones Cy3 y Cy5), obtenidos a través del uso de equipo de escaneo

	Block	Column	Row	Name	ID	X	Y	Dia.	F635 Medi	F635 Mean	F635 SD	B635 Medi	B635 Mean	B635 SD	% > B635
31	1	1	1	R34425:De	36894	2080	5110	90	1257	1276	451	250	262	85	100
32	1	2	1	BM970759	N/A	2290	5110	90	682	687	177	290	332	219	90
33	1	3	1	BM549033	5548382	2500	5110	90	1214	1210	449	301	314	110	100
34	1	4	1	F12650:De	N/A	2680	5110	90	516	509	158	307	314	102	75
35	1	5	1	R14519:He	29305	2890	5110	100	483	496	170	275	282	84	76
36	1	6	1	R14442:He	28821	3090	5100	60	543	520	160	295	308	154	71
37	1	7	1	R14205:He	28397	3280	5110	70	431	437	118	293	305	89	65
38	1	8	1	Unresolved	Unresolved	3480	5100	80	613	676	261	317	324	89	92
39	1	9	1	H52870:De	N/A	3690	5100	90	1126	1154	323	335	349	109	100
40	1	10	1	R13372:He	28361	3890	5100	90	740	767	289	336	347	127	90
41	1	11	1	R61410:He	37974	4080	5100	90	1325	1467	975	303	325	156	84
42	1	12	1	BM564491	5737347	4290	5110	110	659	741	329	270	285	94	96
43	1	13	1	R38905:He	24701	4480	5110	100	1846	1691	573	262	276	99	100
44	1	14	1	T80488:He	24605	4690	5110	100	851	872	197	276	297	164	100
45	1	15	1	T78664:He	24064	4880	5090	90	866	884	184	293	432	580	48
46	1	16	1	T78207:In	24127	5080	5100	100	855	836	200	294	308	108	100
47	1	17	1	T78359:He	24149	5280	5090	90	1230	1374	887	316	325	107	96
48	1	18	1	T78739:He	24067	5480	5100	90	600	618	149	320	348	167	78
49	1	19	1	T77316:He	23676	5690	5110	110	692	702	220	332	360	185	73
50	1	20	1	T77273:He	23728	5890	5110	100	817	815	269	311	351	105	95

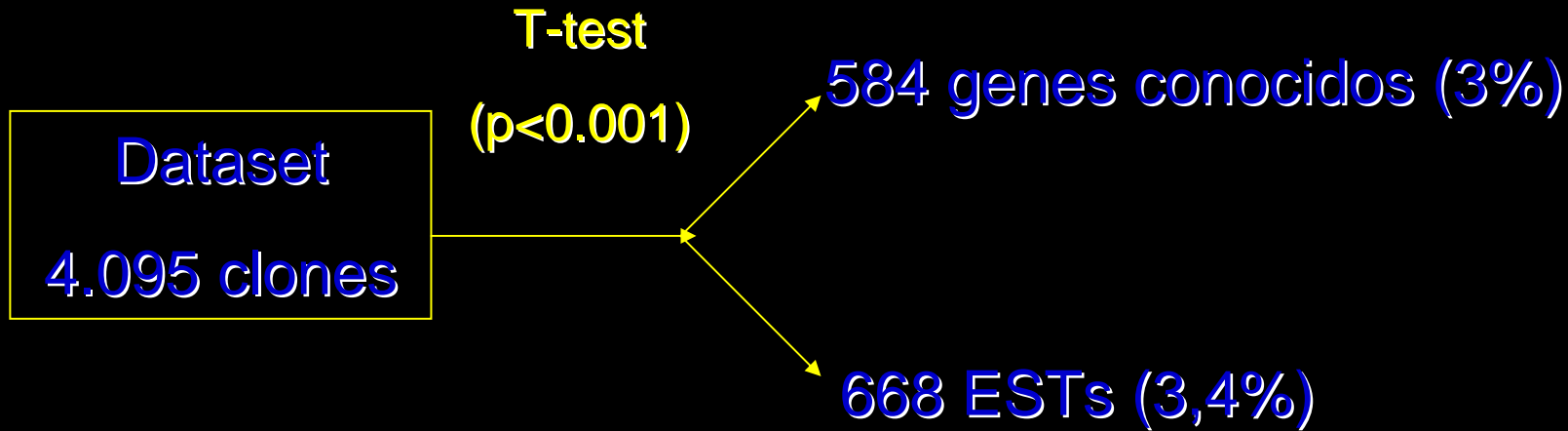
Analisis de datos

Los 25 set de datos crudos (19.200 x 25 \Rightarrow 480.000 puntos) se cargaron en una serie de programas obtenidos de la *bioinformatic facility* del **TIGR** (The Institute for Genomic Research):

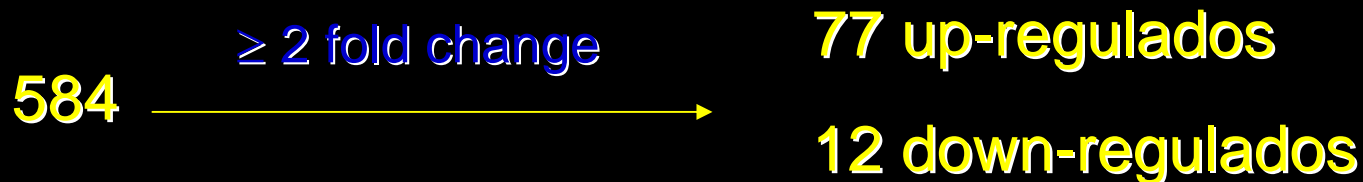
- 1- **Express Converter** v1.5; lee los archivos de datos de los microarrays de varios formatos y los transforma generando un *output* con el formato deseado.
- 2- **MIDAS** (Microarray Data Analysis System) v2.18; el MIDAS nos permitió preprocesar y realizar la normalización de los datos
- 3- **MeV** (MultiExperiment Viewer) v3.0; una aplicación que permite el análisis estadístico, la identificación de los genes y de los patrones de expresión de interés.
- 4- **EASE** (Expression Analysis Systematic Explorer) para la agrupación funcional de los datos.

<http://david.niaid.nih.gov/david/ease.htm>

Análisis de la expresión global de los genes en los pacientes con CCR



Diferencialmente expresados en colon vs. mucosa normal



Confirmación independiente de los datos

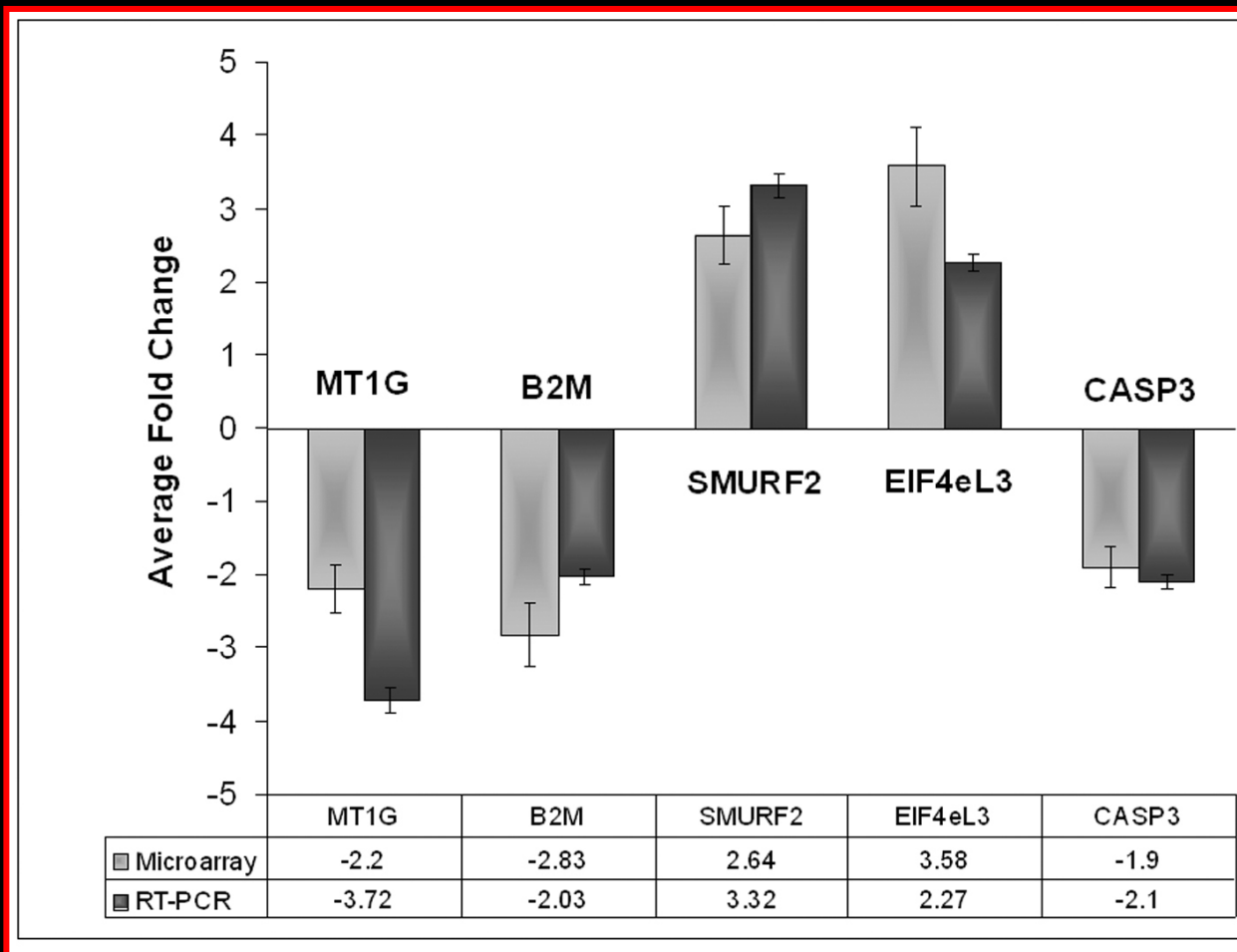
El objetivo de la confirmación independiente de los datos es generar *confianza en las estimaciones* y descubrimientos eventuales; esto se logra al demostrar que los datos que emergen del estudio con microarrays, se replican por métodos clásicos de detección molecular:

qRT-PCR

Western blotting

Inmunohistoquímica

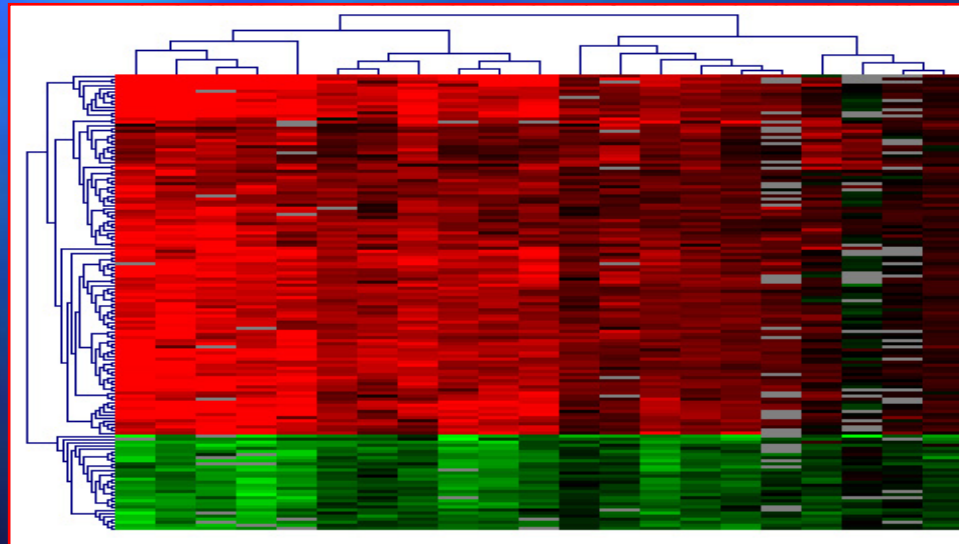
Validación con Real-Time PCR



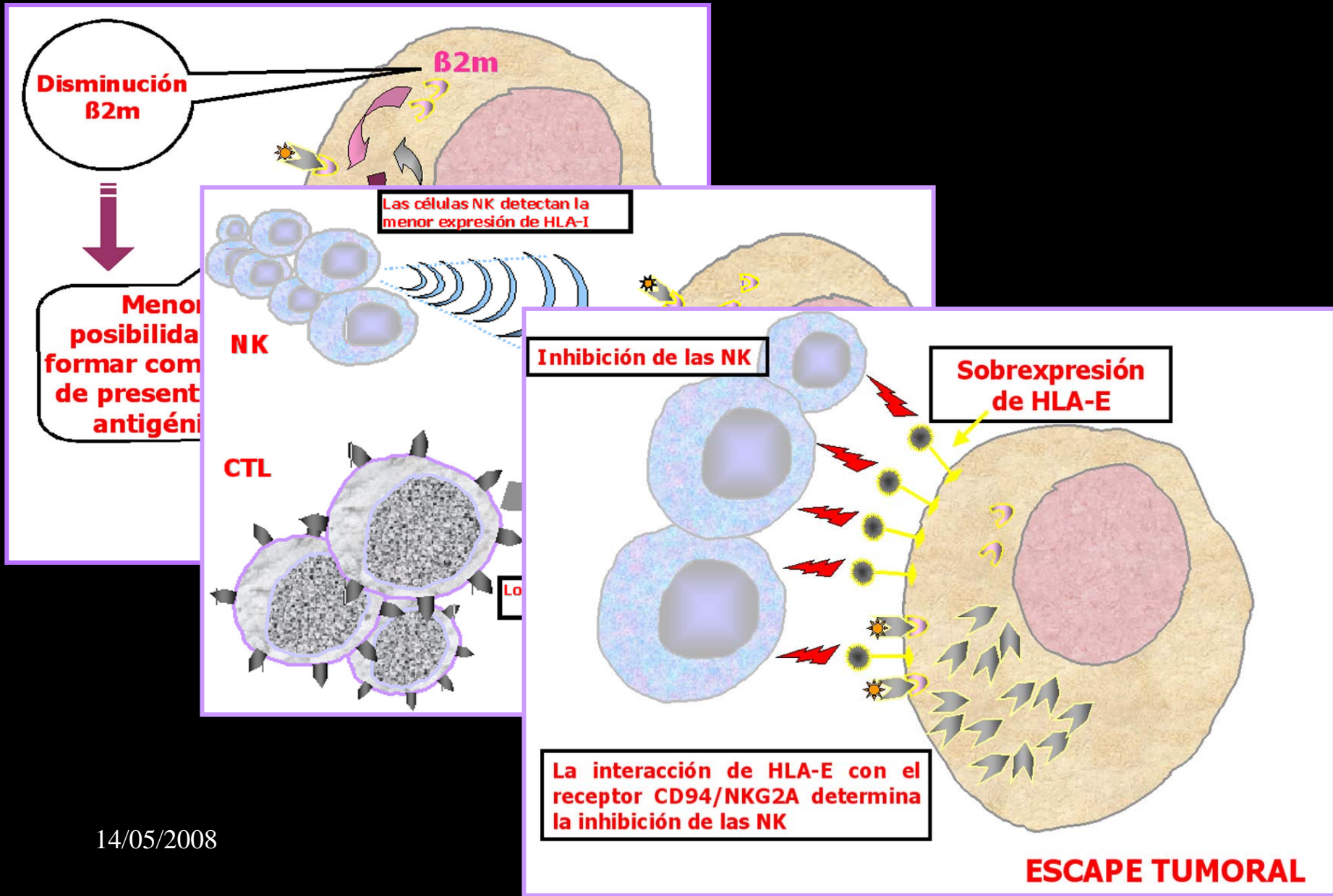
	005 A	001 B	007 B2	008 C2	014 C2	013 D	012 MTS
OATP1A2 (SLCO1A2)		1,42				10,52	
CAT2 (SLC7A2)	-1,60	-0,56	0,06	-0,74	-1,23	0,31	0,82
OAT4 (SLC22A11)	-3,99	4,22	-0,86	-2,08	1,65	1,61	0,67
MCT1 (SLC16A1)	-3,67	-1,70	-2,70	-0,42	0,00	1,32	-2,81
ZNT5 (SLC30A5)	-1	0	0	-1	0,58	2,21	-2
GLUT1(SLC2A1)	1,79	0,07	2,96	1,03	6,44	4,72	1,24
LUNAPARK	0,00	1,56	0,77	0,58	0,79	2,47	0,36
TMEM130	-0,67	-3,23	-2,95	0,28	-4,38	-3,12	-4,85
SELI		0,83	0,55	0,38	-1,46	0,90	0,83
PAK6	-0,15	1,24	4,07	-1,78	7,77	5,83	3,68
CSPG3	-10,87	0,22	-1,58	-3,05	-0,32	0,93	1,68
IFN- γ	-2,20	2,12	1,48	6,11	2,77	4,32	-2,18
F2 (PROTROMBINA)		-0,85	-0,86		2,34	-2,31	12,96
GDA		3,33	1,59	-2,51			-1,38
RABL3		0,41	-0,32	-0,90	0,94	1,82	-0,92
SQSTM1	0,81	0,58	-0,42	0,00	1,08	0,00	1,38
TFCP2L2							
TRIM50C							
WDR31							
TMEM56							
ALDH8A1							
CACDNA2D2							
FKBP6							
HMGCLL1							
MTSS1							
RP1L1							

Métodos de agrupamiento y visualización de los datos

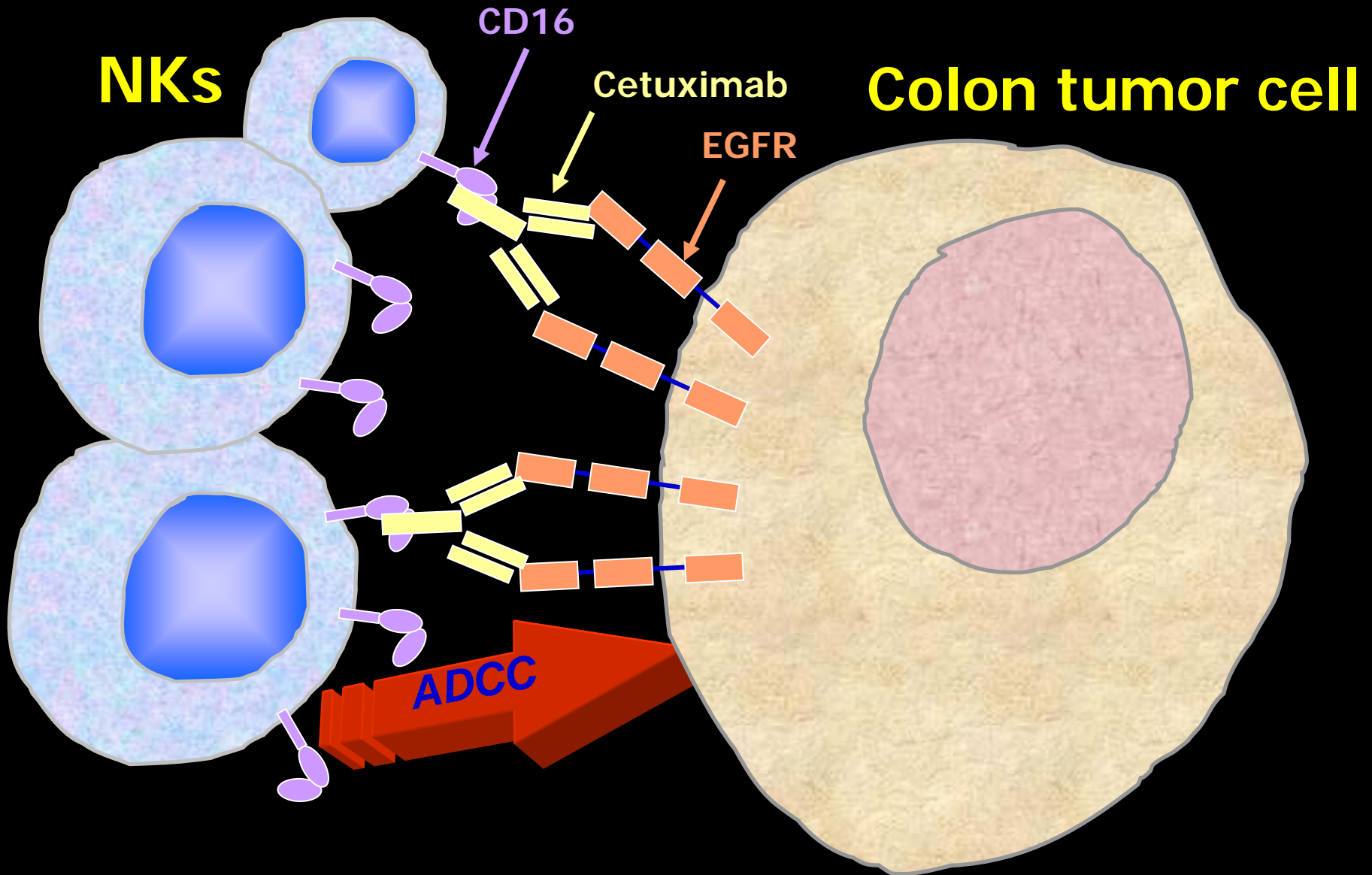
- El análisis de agrupamiento o Clustering de la matriz de expresión consiste en reunir genes basándose en la similitud de su perfil de expresión
- Existen métodos no supervisados (class discovery) y supervisados (classification) basándose en datos previos para concentrar los patrones de expresión relacionados.

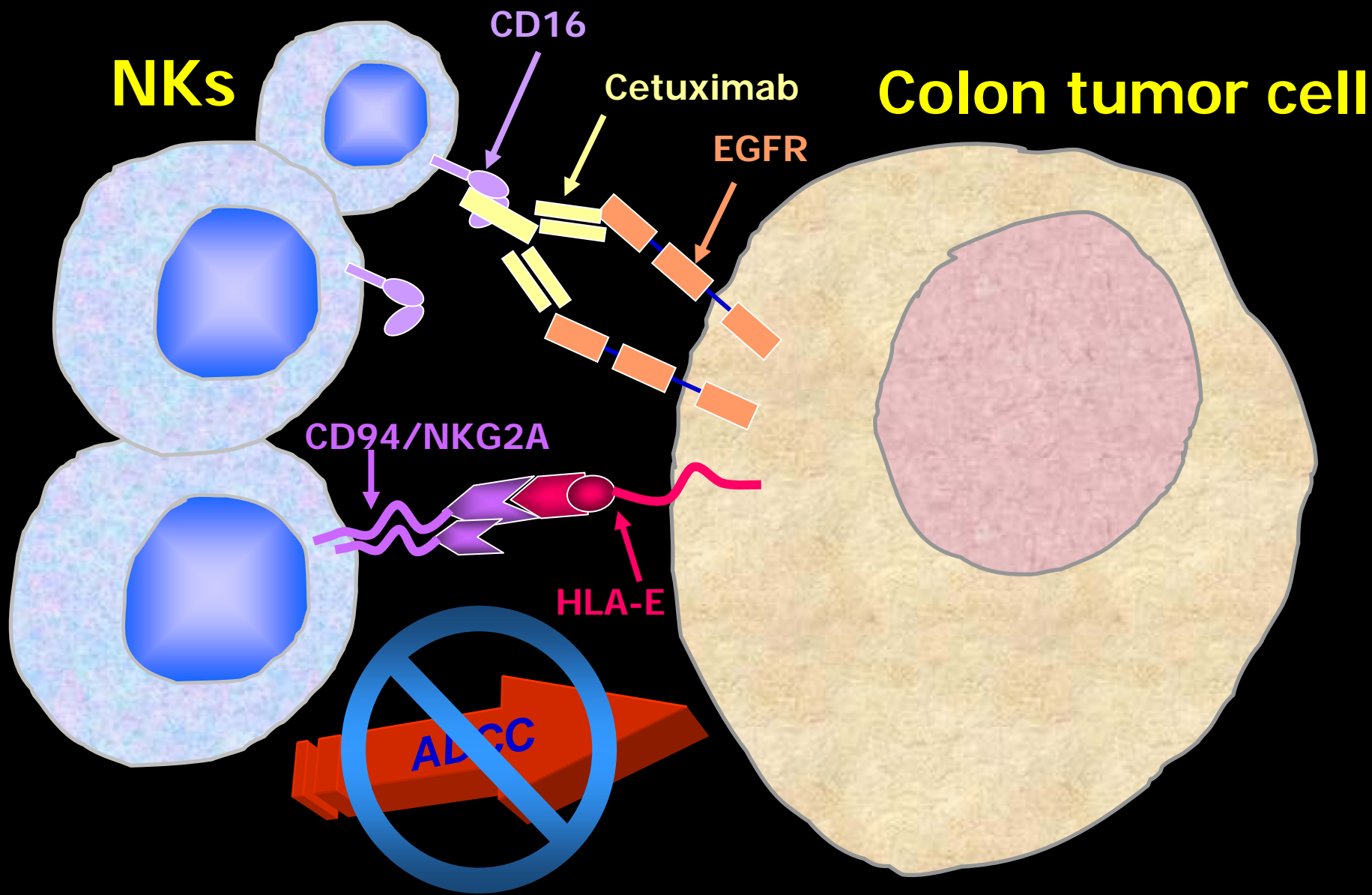


¿Estrategia de escape tumoral?



Cetuximab mediated-ADCC



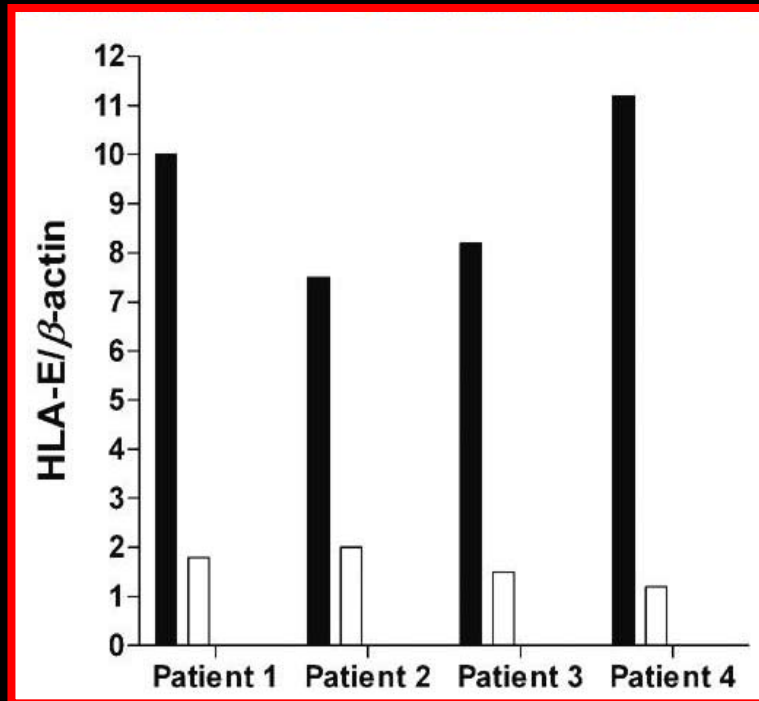
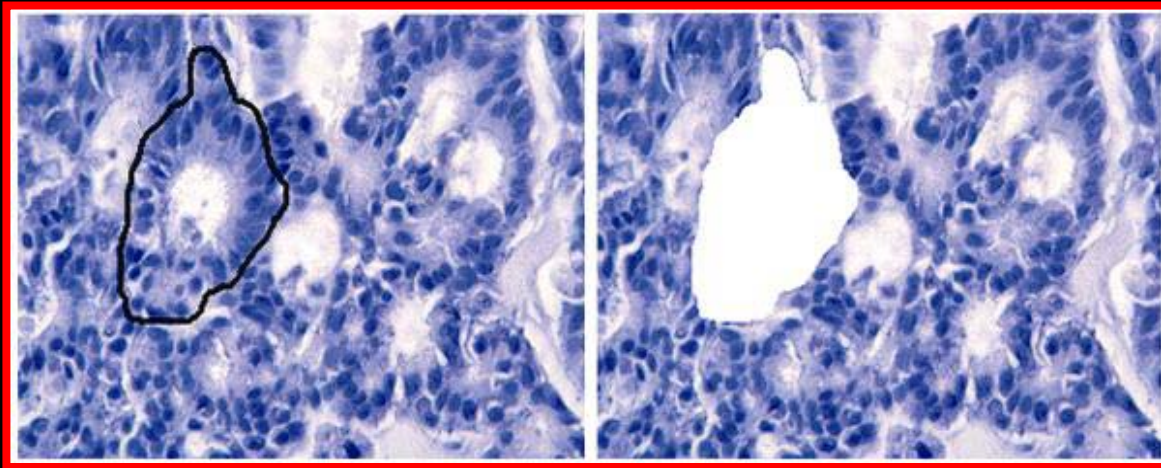


Heterogeneidad de la muestra

- La heterogeneidad que presentan líneas celulares inmortalizadas es mínima ante la que pueda presentar una biopsia tomada de un tejido tumoral.
- Tampoco debemos olvidarnos que los tejidos son de diversa composición celular y que cada una de estas células activará diferentes programas de expresión ante diferentes estímulos.

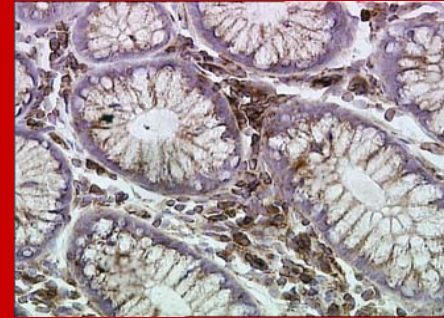
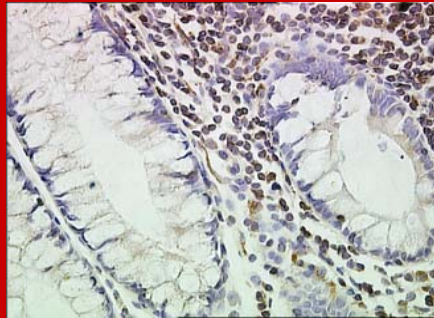
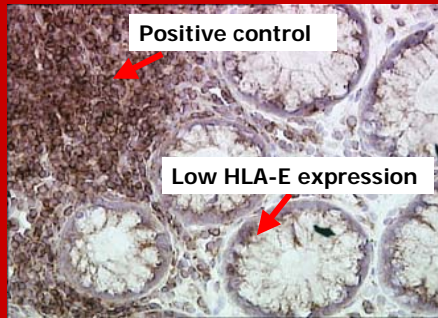
Microscopio Leica AS LMD



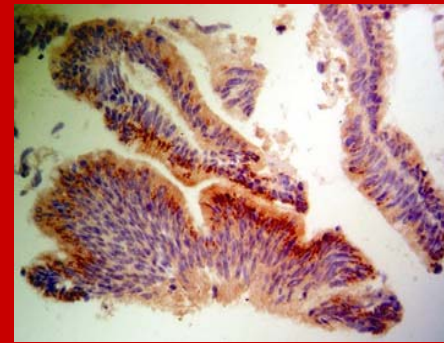
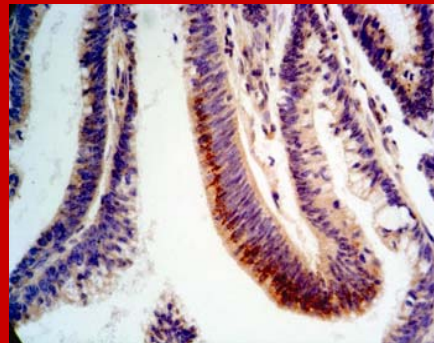
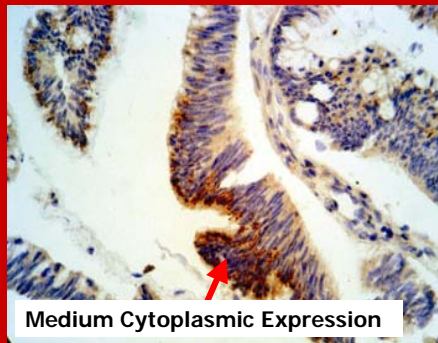


Inmunohistoquímica de HLA-E sobre 42 tumores CCR humanos

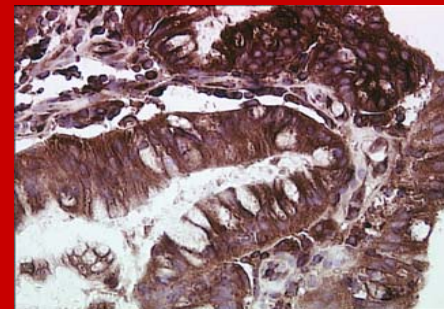
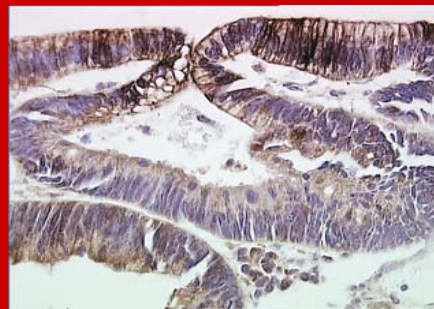
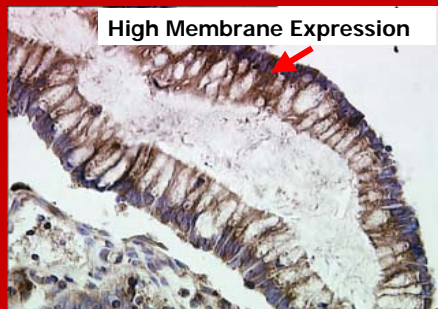
Normal



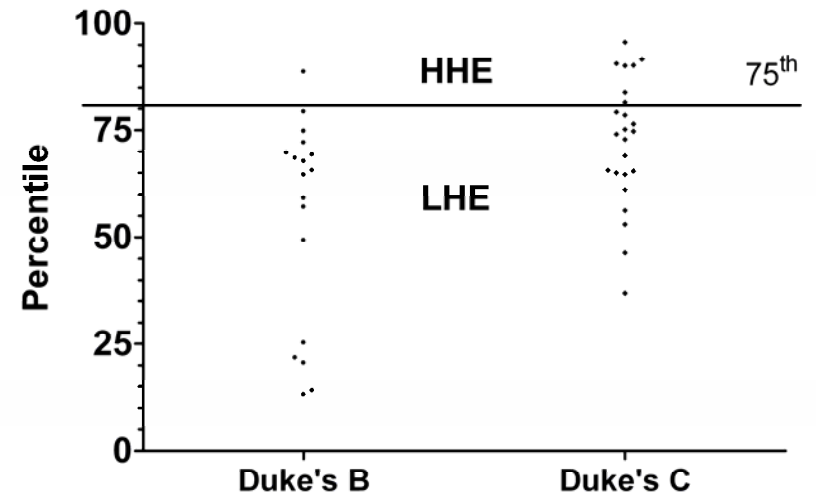
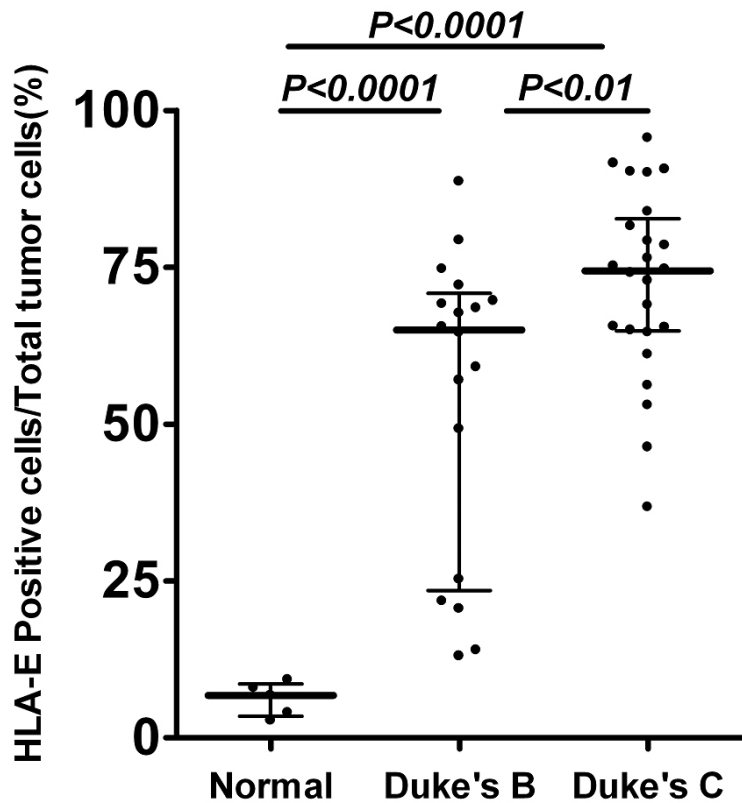
Duke's B

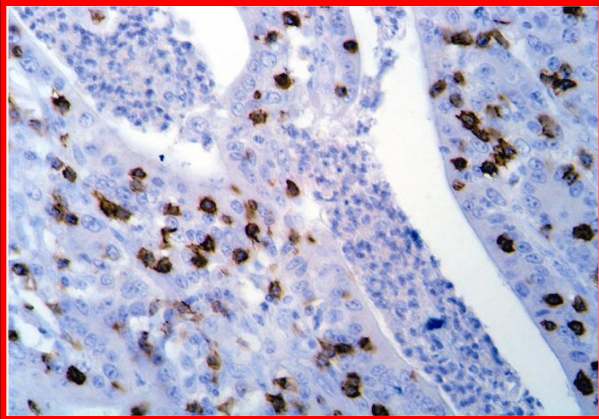
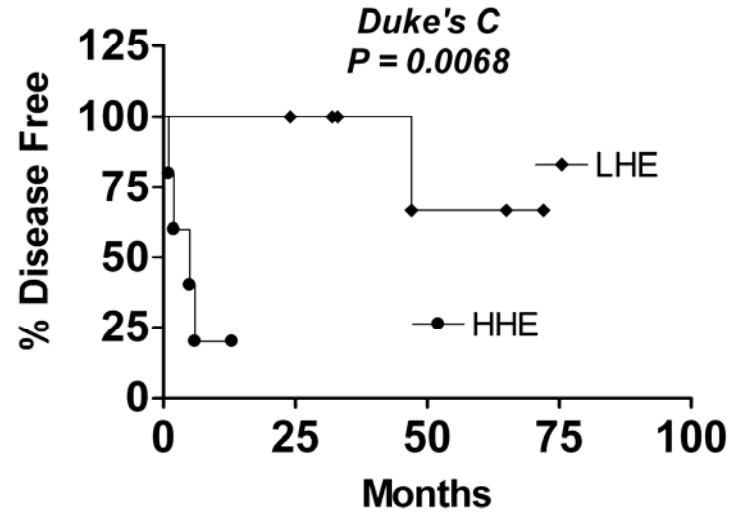
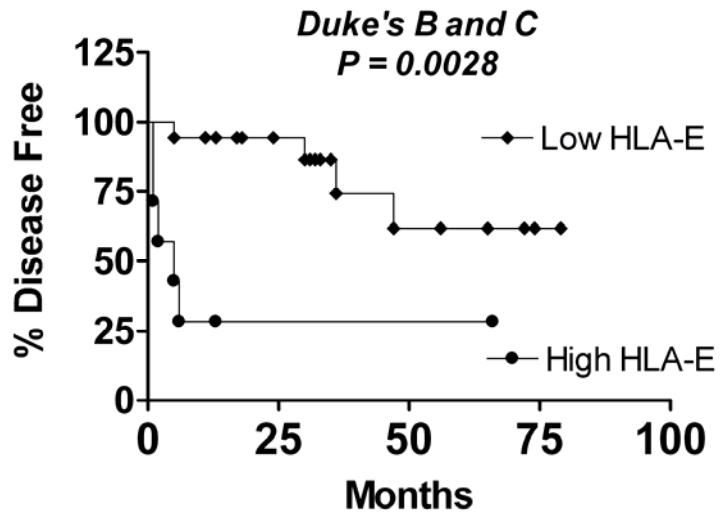


Duke's C

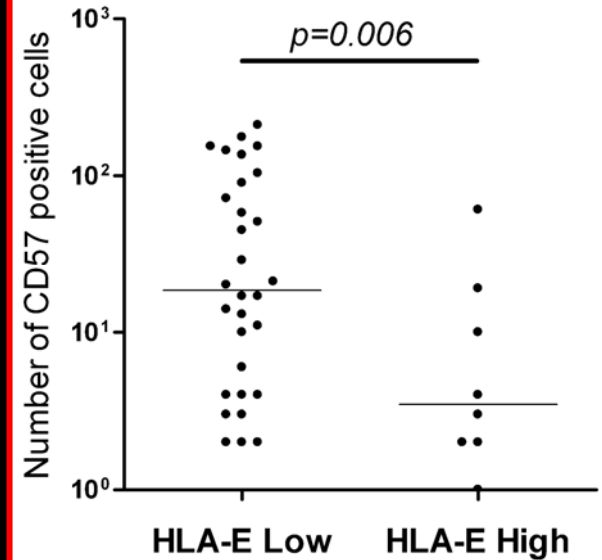
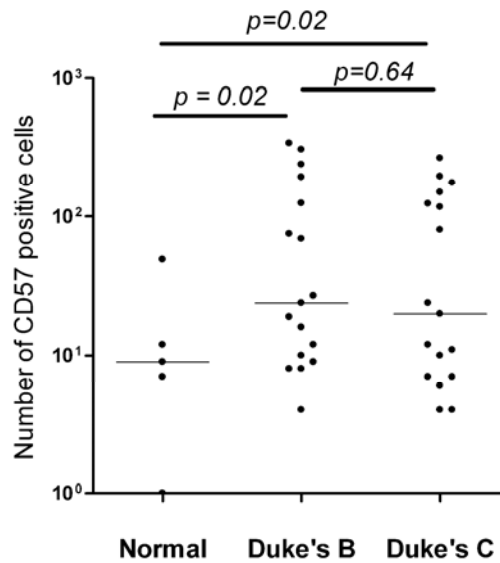


Estadística del conteo de células HLA-E positivas





Inmunohistoquímica del infiltrado de CD57



Hipótesis y objetivos futuros

- Los pacientes con altos niveles de HLA-E y mal pronóstico no serían buenos candidatos para una terapia con anticuerpos monoclonales.
- Esto podría tener una relevancia particular en los pacientes de Duke's C, los cuales muestran una fuerte correlación entre la expresión de HLA-E y la baja sobrevida libre de enfermedad.
- Nuestro objetivo será estudiar en 20 biopsias EGFR negativas y 40 EGFR positivas (20 que respondieron al tratamiento y 20 que no respondieron) la expresión de las proteínas HLA-E y CD56 por inmunohistoquímica de micromatrices de tejido de colon (TMA, Tissue Microarray).

Microarrays de proteínas

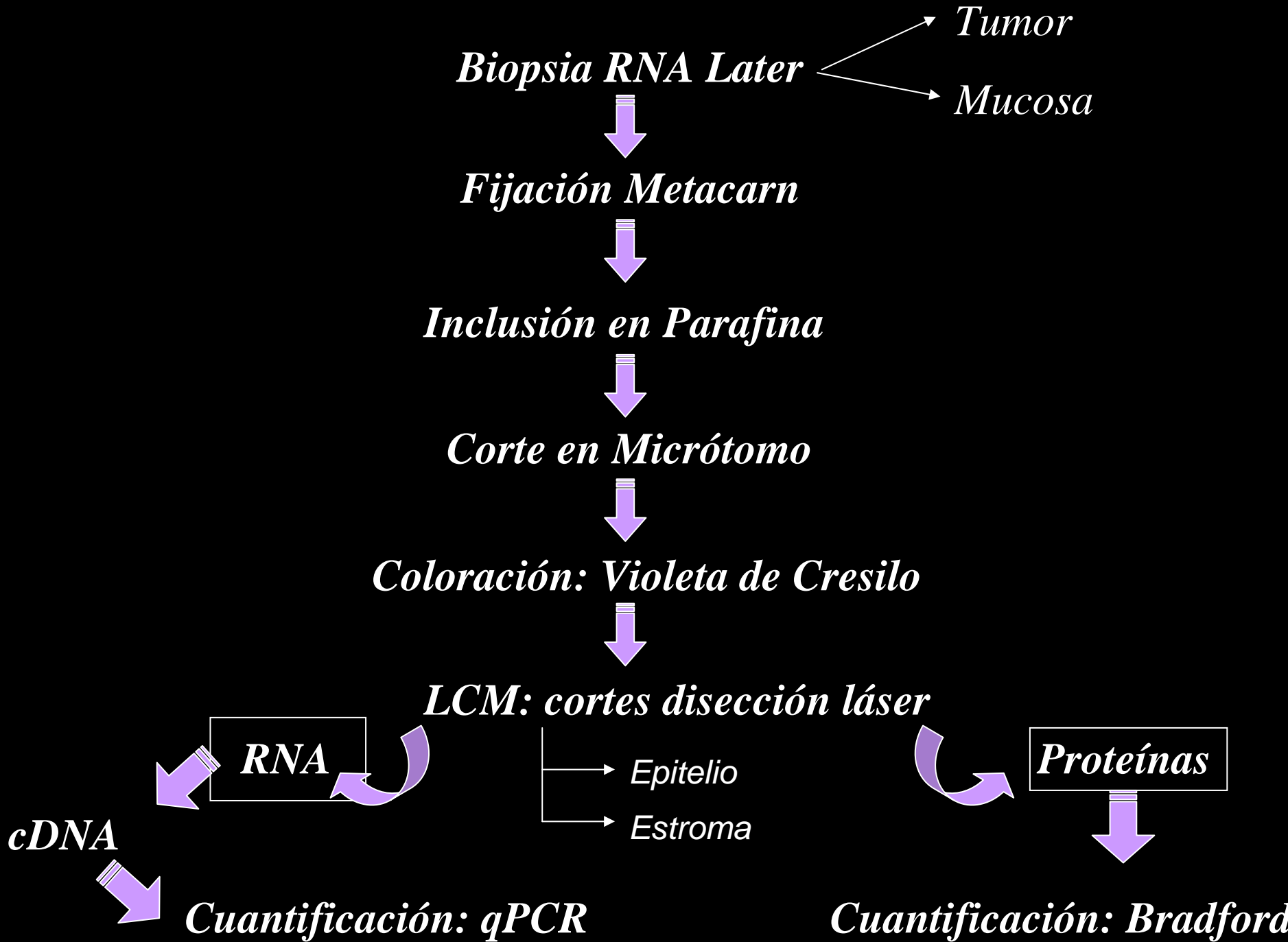
- Los microarrays de proteínas son de gran utilidad en el análisis proteómico funcional, y consisten en *chips* de proteínas inmovilizadas en una posición concreta sobre una superficie sólida.
- La complejidad y diversidad estructural de las proteínas ha hecho que el desarrollo de los microarrays de proteínas haya sido técnicamente complicado.
 - No existe una técnica equivalente a la PCR capaz de amplificar la cantidad de proteína existente en una muestra.
 - No tienen una carga negativa como en el caso del ADN, sino que la carga de las proteínas es muy variable.

Microarrays de identificación y cuantificación de proteínas

- Se basan en la captura de proteínas por medio de moléculas de diversa naturaleza que permanecen ancladas a la superficie del microarray.
 - Anticuerpos
 - Affibodies
 - Aptameros (*Eastern Blotting*)

Microarrays de *screening* inverso de proteínas

- Mediante el *screening* inverso se inmovilizan lisados celulares que representan todo el repertorio de proteínas celulares en un determinado estadio celular.
- Es posible realizar un *screening* de todos los anticuerpos presentes en el suero de un paciente en busca de una determinada proteína.
- Esta técnica tiene un enorme potencial en la detección de biomarcadores en análisis proteómicos.

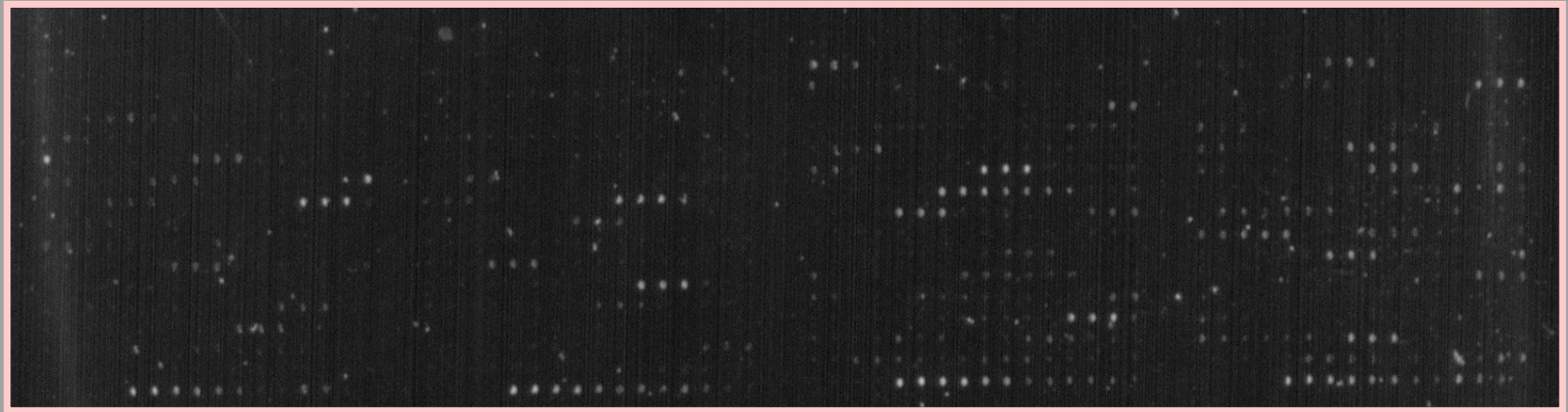


Microgrid II



FAST® Slides

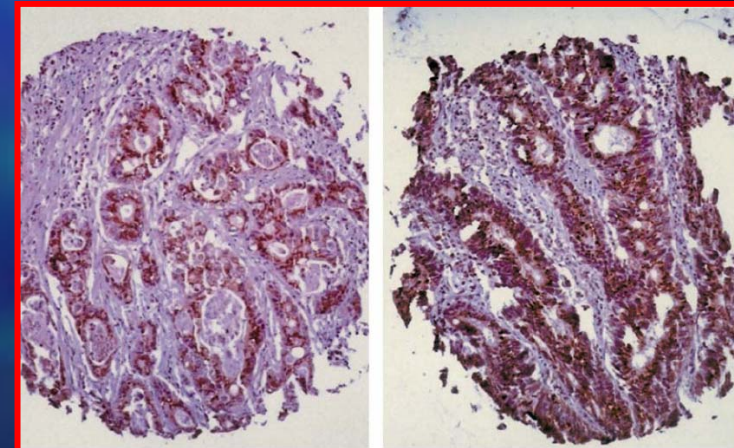
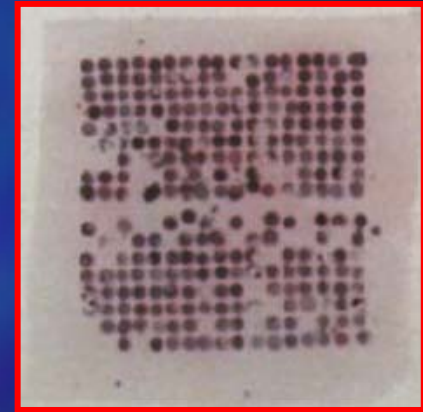
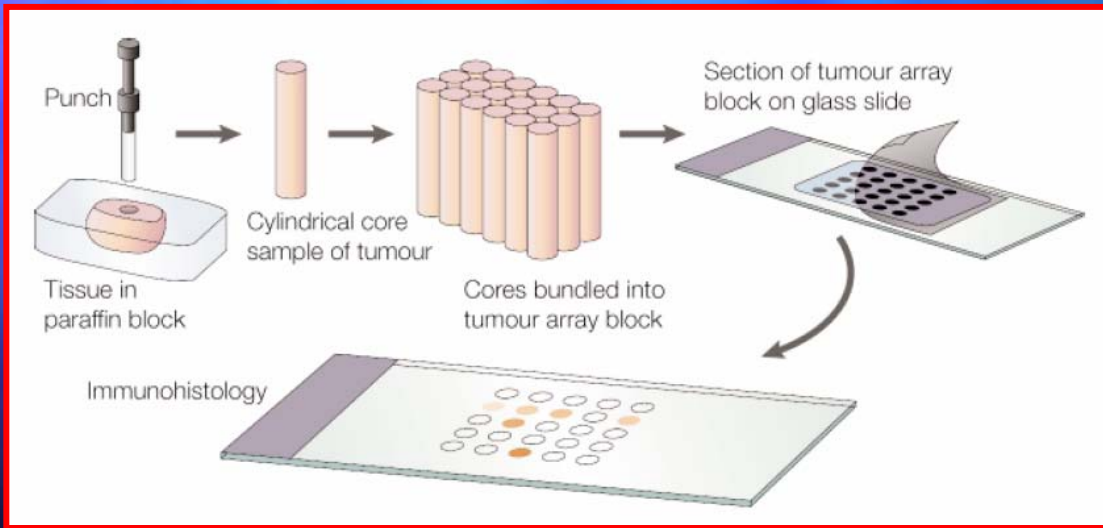




1088 puntos por cada array

Microarrays de tejidos (TMA)

- Consisten en colecciones miniaturizadas de hasta 1.000 muestras de tejido inmovilizadas sobre un soporte que permite el *screening* de ADN, ARN y proteínas.



Segunda parte

APLICACIONES DE LOS MICROARRAYS EN ONCOLOGIA

PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS MICROARRAYS DE ÁCIDOS NUCLEICOS DISPONIBLES COMERCIALMENTE

Empresa	Producto	Características
Advanced Array Technology SA	StaphyChips™	Microarray para la detección de las secuencias de ADN de las 5 especies más importantes de <i>Staphylococcus</i> , así como para la detección de resistencia a antibióticos beta-lactámicos
	Rat HepatoChips	Determinación del patrón de genes expresados en cultivos de hepatocitos incubados en presencia de compuestos químicos o contaminantes ambientales
Affymetrix, Inc.	Lymphochip	Clasificación molecular de linfomas
	GeneChip® Porcine Genome Array	Análisis del transcriptoma completo del cerdo doméstico
Agilent Technologies, Inc.	Agilent G4130A	Microarray para el screening del genoma de rata y estudios toxicogenómicos para la determinación de los efectos en el organismo de una sustancia tóxica, fármaco o pesticida
	Human 1B Oligo Microarray	Análisis de expresión génica en desarrollo de fármacos y estudio de enfermedades
	Rice Oligo Microarray Kit 60-meR	Determinación de la actividad de genes en arroz y cereales. Identificación de variedades con alta tolerancia a sequía, salinidad, frío o plagas para sembrar en terrenos poco cultivables
BioDoor Gene Technology Ltd.	BioDoor4000	Análisis de expresión de 4.000 genes humanos completos
	BiodoorHCV	Diagnóstico de Hepatitis C
BioForce Nanosciences, Inc.	ViriChip™	Perfil de expresión de ARN y detección de virus

PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS MICROARRAYS DE PROTEÍNAS COMERCIALIZADOS

Empresa	Producto	Aplicación
Advanced Gene Technology, Corp.	HerboChip®	Búsqueda de compuestos activos en plantas.
	HerboLink®(AGTChip)	
Axcell Biosciences	TranSignal™ WW domain arrays	Determinación de interacción entre proteínas
	TranSignal™ PDZ domain arrays	Determinación de la función de proteínas
	TranSignal™ SH3 domain arrays	
Azign Bioscience A/S	Designarray™	Análisis de enfermedades concretas
	Specifictargetarray™	Análisis de dianas terapéuticas
Hypromatrix, Inc.	AntibodyArray™ Signal Transduction Antibody	400 anticuerpos contra proteínas de señalización bien caracterizadas
	Apoptosis AntibodyArray	150 anticuerpos contra proteínas que regulan la apoptosis
	CellCycle AntibodyArray	60 anticuerpos contra proteínas involucradas en ciclo celular
Invitrogen	Protoarray™ Human Protein Microarray	Screening de 1.800 proteínas de diferentes familias génicas como quinasas, proteínas asociadas a membrana, proteínas de señalización celular y proteínas implicadas en metabolismo

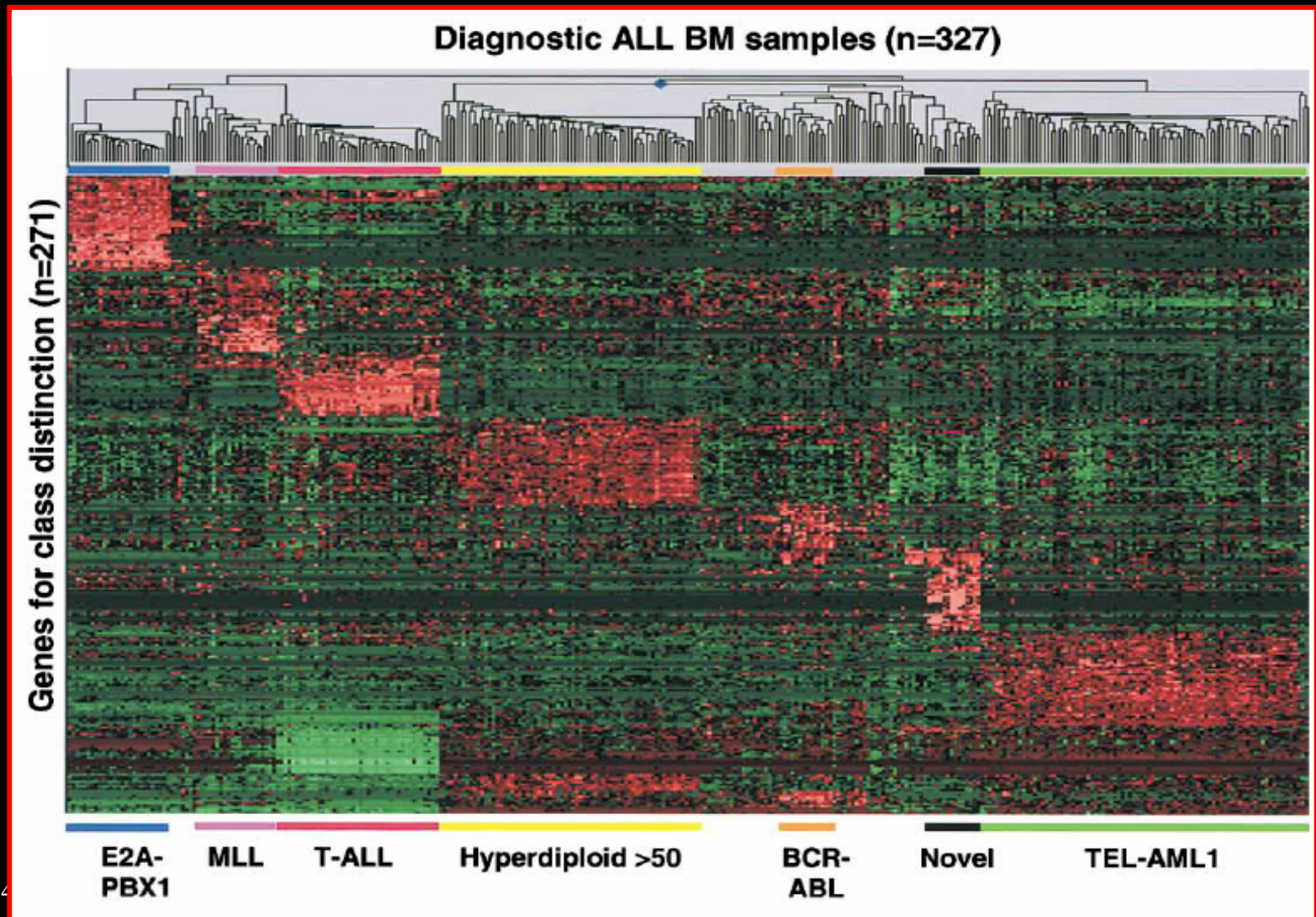
PRINCIPALES APLICACIONES DE LOS MICROARRAYS DE TEJIDOS DISPONIBLES COMERCIALMENTE

Empresa	Producto	Características
Ambion, Inc	LandMark™ Tissue MicroArrays	Análisis del perfil de expresión diferencial de dianas específicas
Ardais Corp.	Ardais Tissue Arrays (ATAs)	Validación de dianas de alto rendimiento
BD Biosciences - Clontech	BD Clontech™ Cancer Cell Line Profiling Array	Perfil de expresión génica de 26 líneas celulares representadas en 11 tejidos
Chemicon Inc.	Chemicon's TMAs	Perfil de expresión de proteínas en diferentes tipos de tumor
Clinomics Biosciences, Inc	HER-2neu response array, c-kit response array	Caracterización de alteraciones genéticas y patrones de expresión
Expression Pathology, Inc	HistoChip™	Determinación de cambios cuantitativos en la expresión de proteínas en un gran número de muestras de tejido enfermo y sano. Identificación y validación de marcadores proteicos
	Liquid Tissue™	

LOS MICROARRAYS DE EXPRESIÓN Y SU EMPLEO EN LA TAXONOMÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

- Cuanto mayor sea nuestra capacidad para clasificar un tumor determinado de forma no ambigua, mayores serán nuestras posibilidades de éxito en la curación de ese paciente.
- Los patrones de expresión nos ayudan a establecer diferencias en la biología y el pronóstico de los tumores.

YEOH EJ, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002; 1: 133-143.

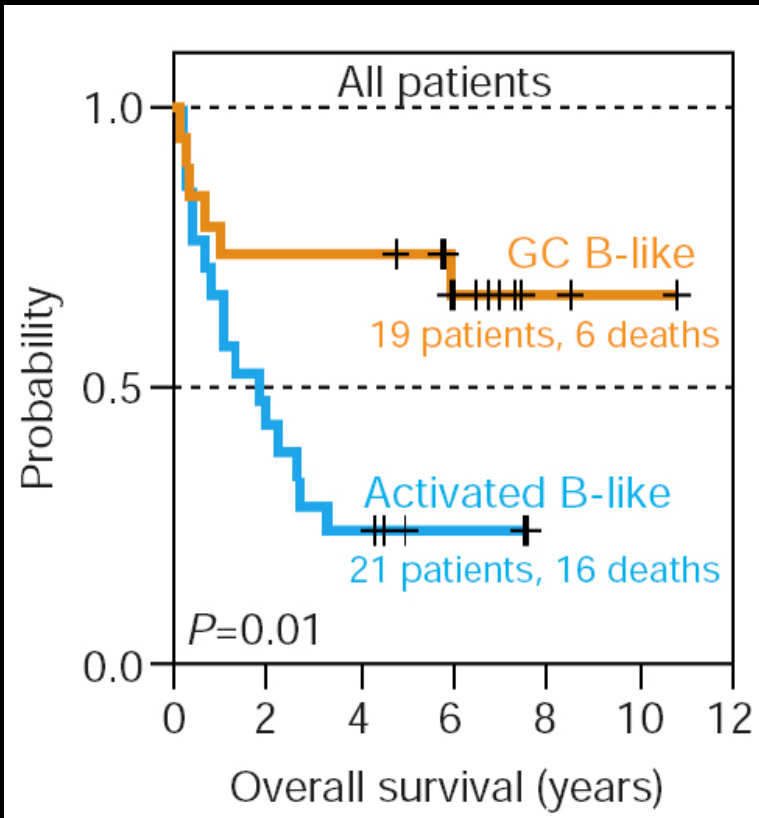
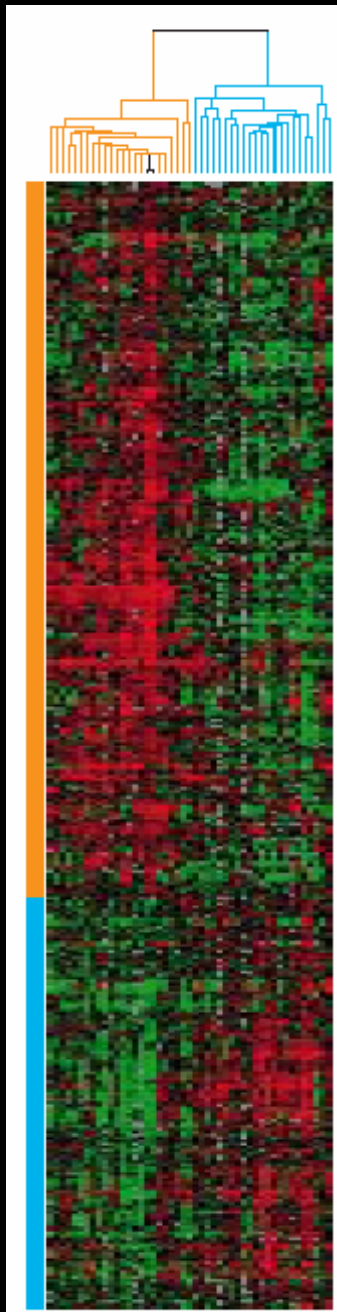


ALIZADEH AA, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature 2000; 403: 503-511.

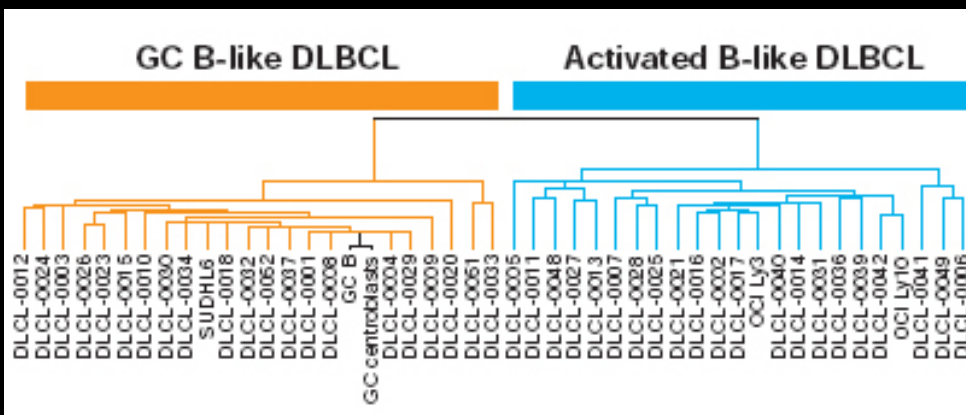
Background — Diffuse large B-cell Lymphoma (DLBCL) is the most common subtype of non-Hodgkin lymphoma; it is clinically heterogeneous and most (60%) of the patients succumb to the disease, while the remainder respond well to the current therapy and have prolonged survival.

Purpose — To test whether gene expression profiles can accurately distinguish among previously established B-cell non-Hodgkin lymphoma classes and reveal additional molecular classes of DLBCL with different clinical courses (i.e. assist in class discovery).

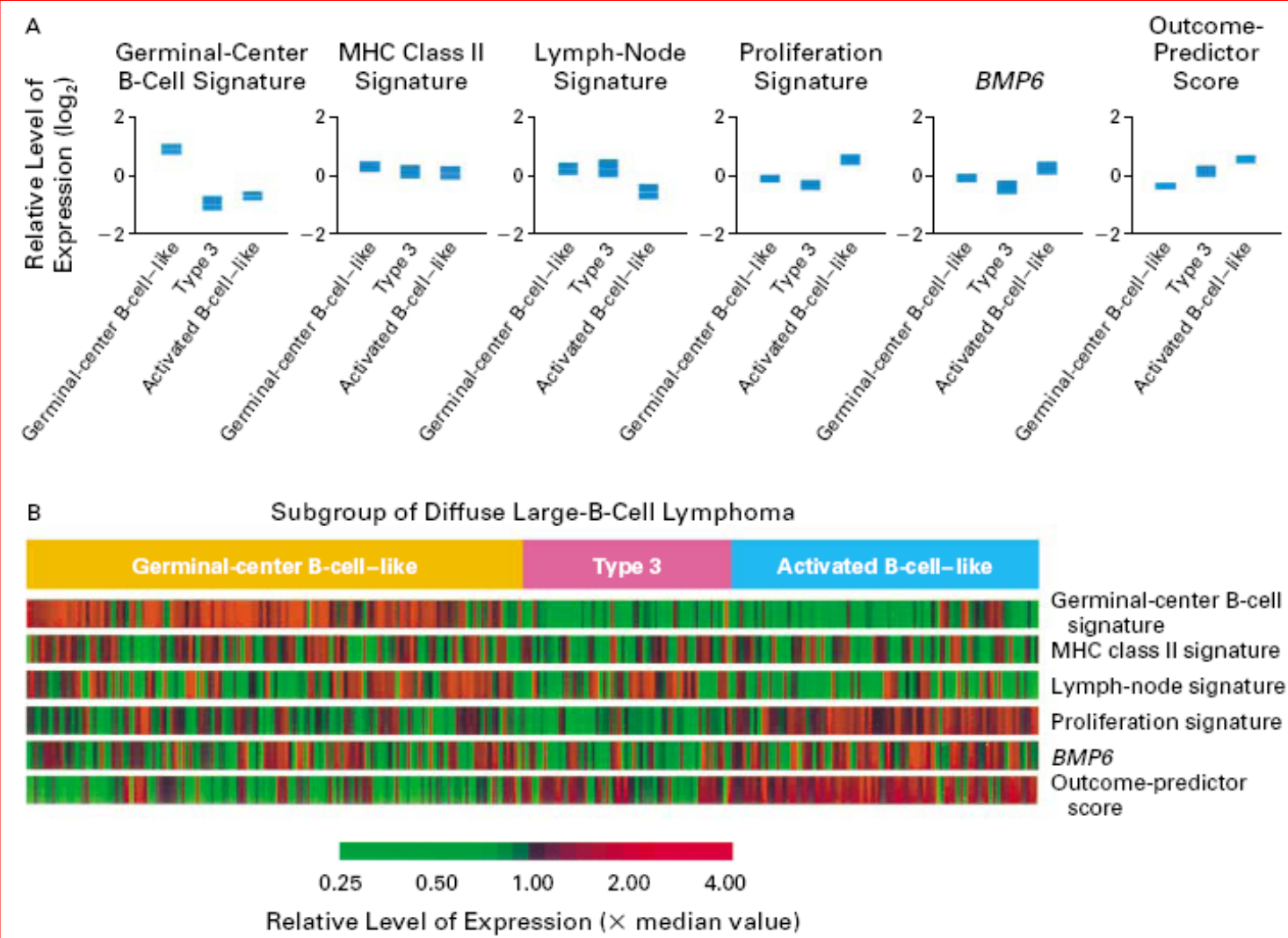
Methods — A cDNA microarray analysis was performed by using a special chip (Lymphochip) that contained gene probes that are selected from cDNA libraries prepared from normal and malignant lymphocytes at different stages of differentiation and activation (a total of 17,856 cDNA clones). Ninety-six mRNA samples were analyzed, including 62 patient samples (42 DLBCL, 11 CLL, 9 FL) and 34 control samples derived from either normal lymphocytes or tumor cell lines.



Results — Based on global similarity in gene expression patterns, hierarchical clustering algorithm accurately segregated the morphologically recognized classes of lymphoma (DLBCL vs FL vs CLL). In addition, restriction of the clustering algorithm to genes that define germinal center B cells revealed 2 distinct gene expression patterns among patients with DLBCL. This molecular sub classification of DLBCL provided independent prognostic information.



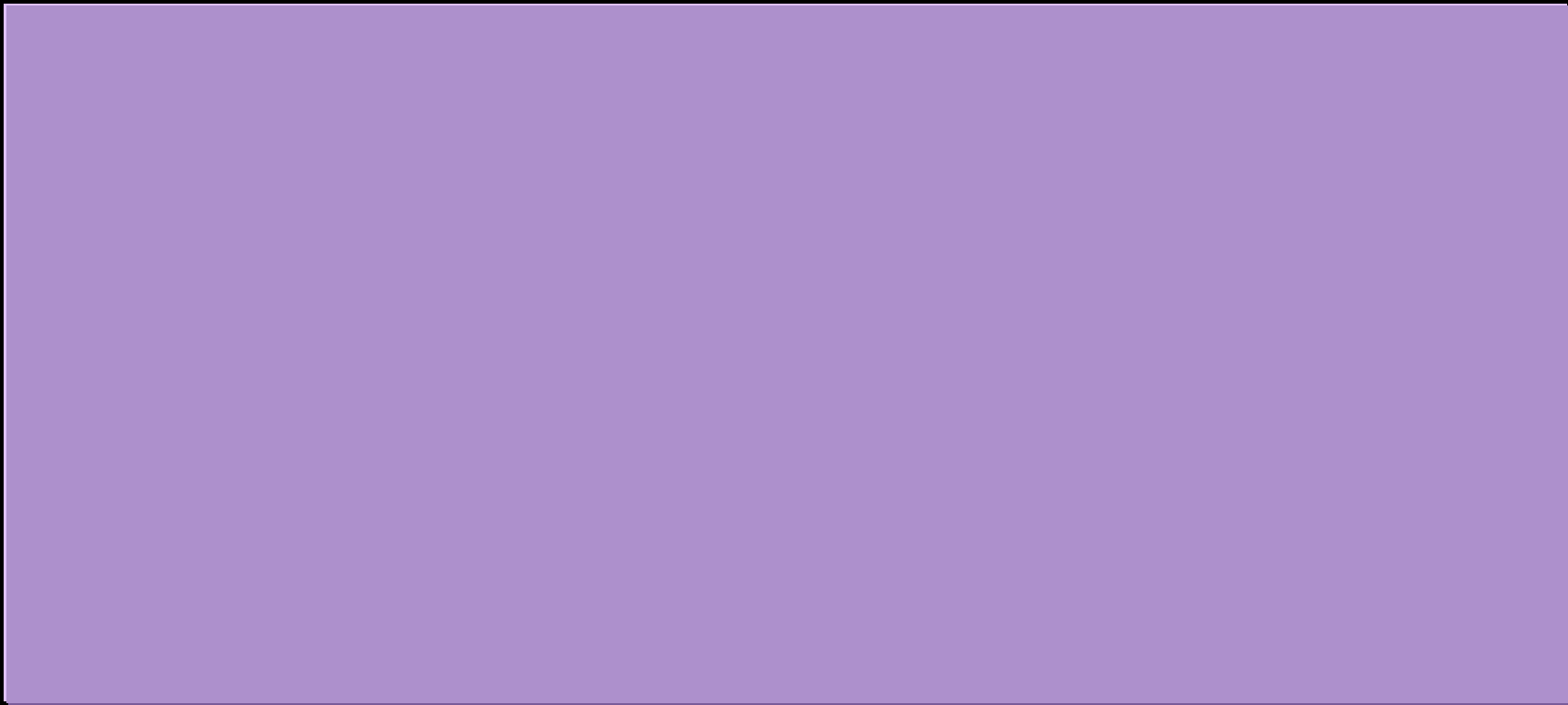
ROSENWALD A, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. N Engl J Med 2002; 346: 1937-1947.



Factores pronosticos en pulmón, próstata y mama

GARBER MED, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 13784-13789.

- The global gene expression profiles for 67 human lung tumors representing 56 patients were examined by using 24,000-element cDNA microarrays.
- Subdivision of the tumors based on gene expression patterns faithfully recapitulated morphological classification of the tumors into squamous, large cell, small cell, and adenocarcinoma.
- The gene expression patterns made possible the subclassification of adenocarcinoma into subgroups that correlated with the degree of tumor differentiation as well as patient survival.
- Gene expression analysis thus promises to extend and refine standard pathologic analysis.



Van 't Veer LJ, Dai H, Vand Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.

The gene-expression profile we studied is a more powerful predictor of the outcome of disease in young patients with breast cancer than standard systems based on clinical and histologic criteria.



OncomiRs: microRNAs en los tumores

- El descubrimientos de estos importantes reguladores se ha atrasado debido a que la búsqueda apuntaba a secuencias genómicas codificantes
 - Cheng J et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005 May 20;308(5725):1149-54.
 - Carninci P et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005 Sep 2;309(5740):1559-63.
 - Katayama S et al. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*. 2005 Sep 2;309(5740):1564-6.

Calin GA, et al Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

- Delección de 30 Kb correspondientes al miRNA cluster mir-15a-16
- Aumento de la actividad anti-apoptotica del gen BCL-2
- Representan antisentidos naturales que pueden ser explotados para la terapia

He L et al Nature. 2005 Jun 9;435(7043):828-33. A microRNA polycistron as a potential human oncogene.

- Amplificación genica y sobreexpresión del miR-17-92 que incluye 7 miRNAs del intron 3 del gen C13orf25 (13q31.3) en linfomas a células B
- Estarían regulando la expresión de factores de transcripción (E2F) que regulan negativamente a otros factores tales como c-Myc

Reducción de los niveles de miRNA en cáncer

- La compresión del funcionamiento de los miRNA sugiere que juegan un papel importante en la diferenciación celular.
- Los tumores muestran un perfil de expresión muy cercano al tejido de origen y una reducida expresión de los miRNA.
- Estudios funcionales sugieren que los miRNA podrían ser factores claves en la pérdida de la capacidad de diferenciación celular.

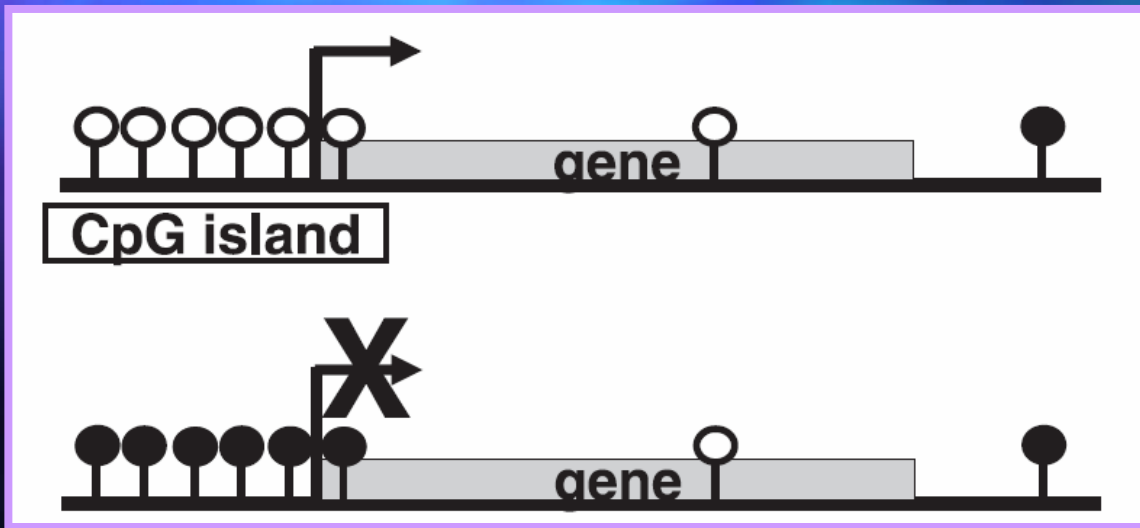
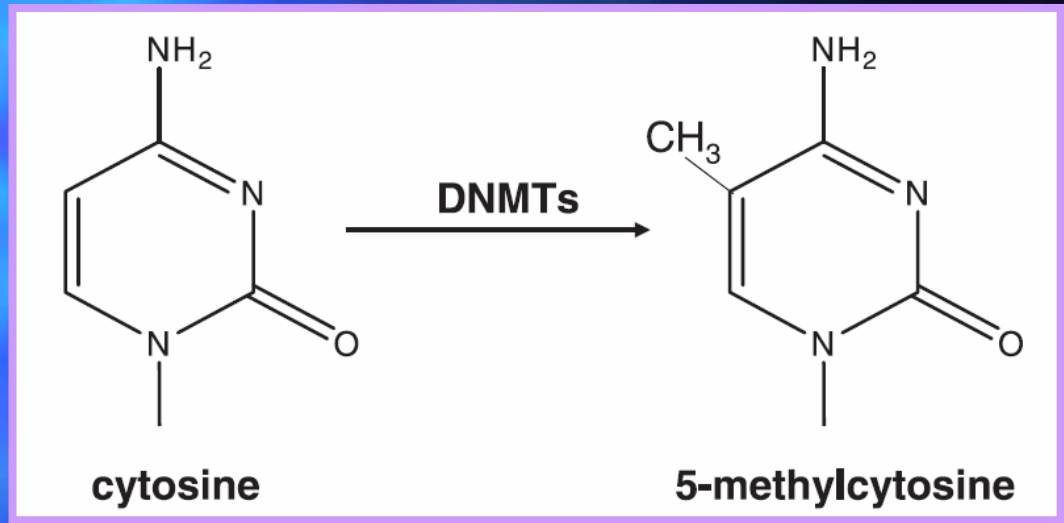
Oncogene or tumor suppressor ?

- La función de cada miRNA depende de su *target* específico
- Los miRNA se regulan a través de diferentes mecanismos

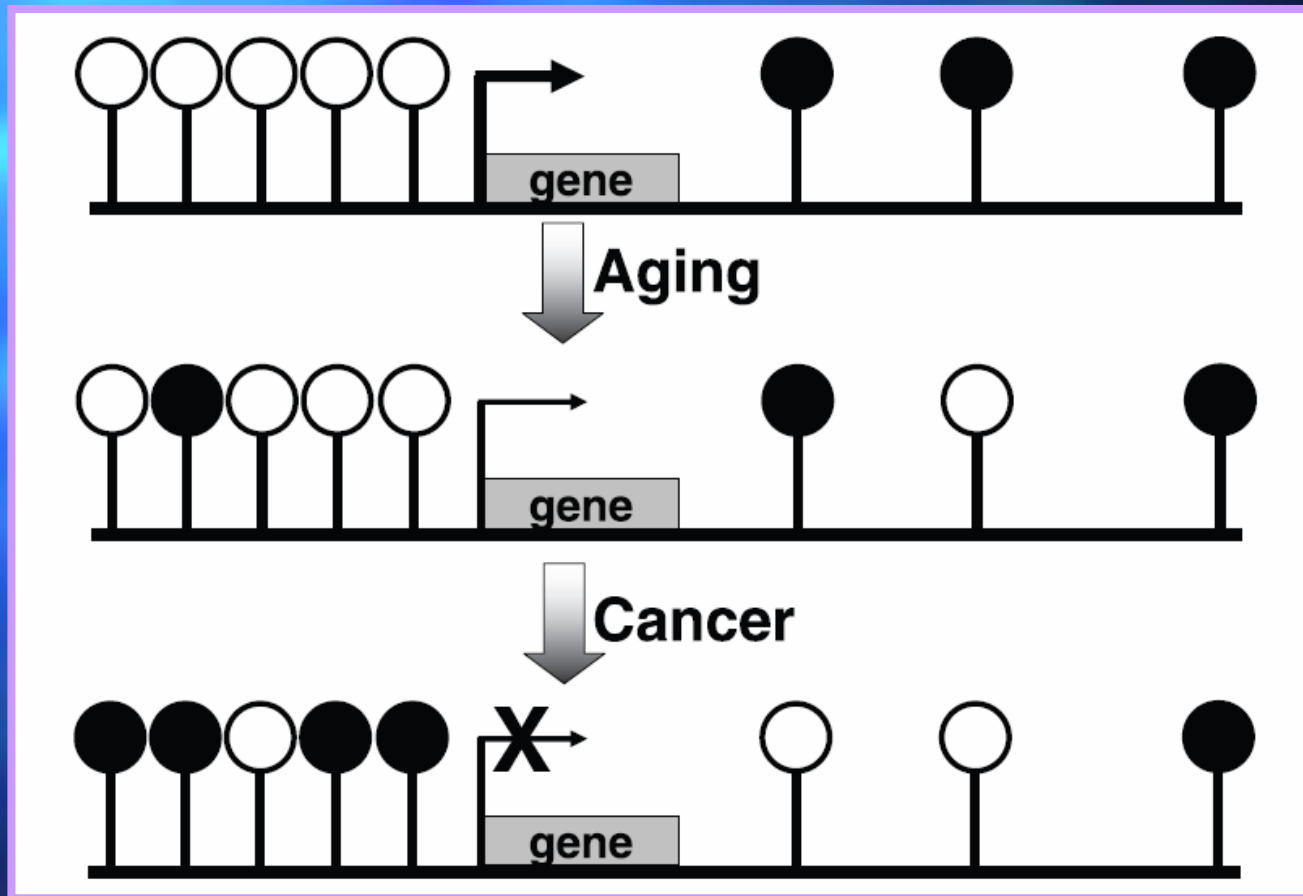
miRNAs como *targets* terapeuticos

- El uso de la tecnologia antisentido podría revelarse util para bloquear los miRNAs oncogenicos.
- Para los miRNAs supresores tumorales la estrategia seria incrementar su funcionalidad o estabilidad en la célula.
- Los inhibidores terapeuticos de los miRNAs se definen *antagomirs*.
 - Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature. 2005 Dec 1; 438(7068):685-9.

Epigenetica



Epigenética y cáncer



Epigenetica, miRNAs y Cáncer

- Mecanismos epigeneticos controlados por miRNAs
- Expresión de miRNAs controlada por mecanismos epigeneticos