

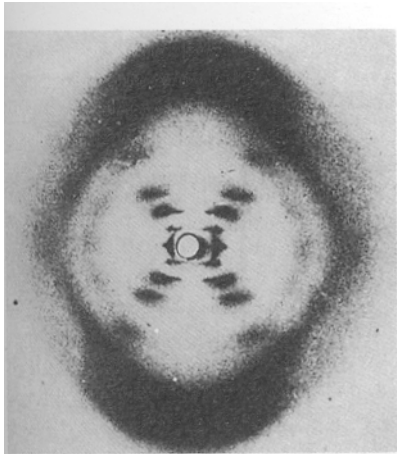
Introducción a la Genética Molecular



Prof. Dra. Carina M. Rivolta



Gregor Mendel, 1865

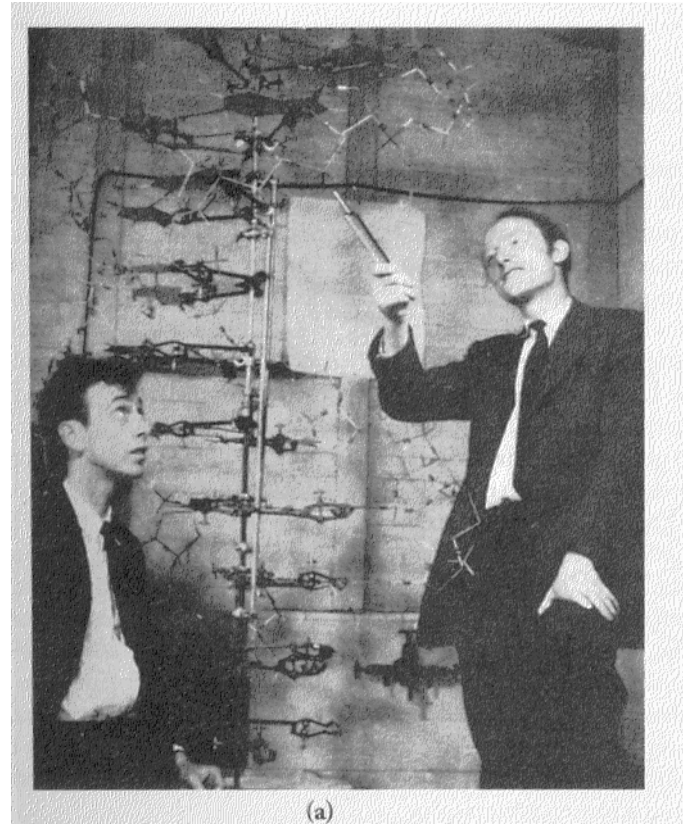


(a)



(b)

Rosalind Franklin
1950-1953



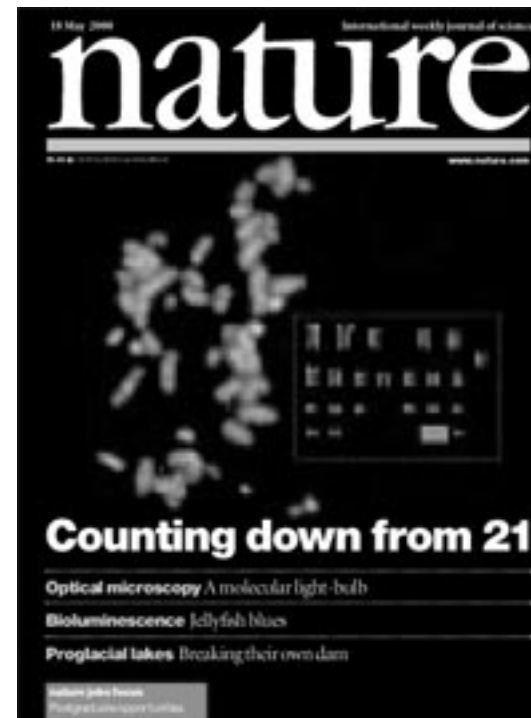
(a)

Francis Crick y James Watson
1953

“PROYECTO GENOMA HUMANO”



1999



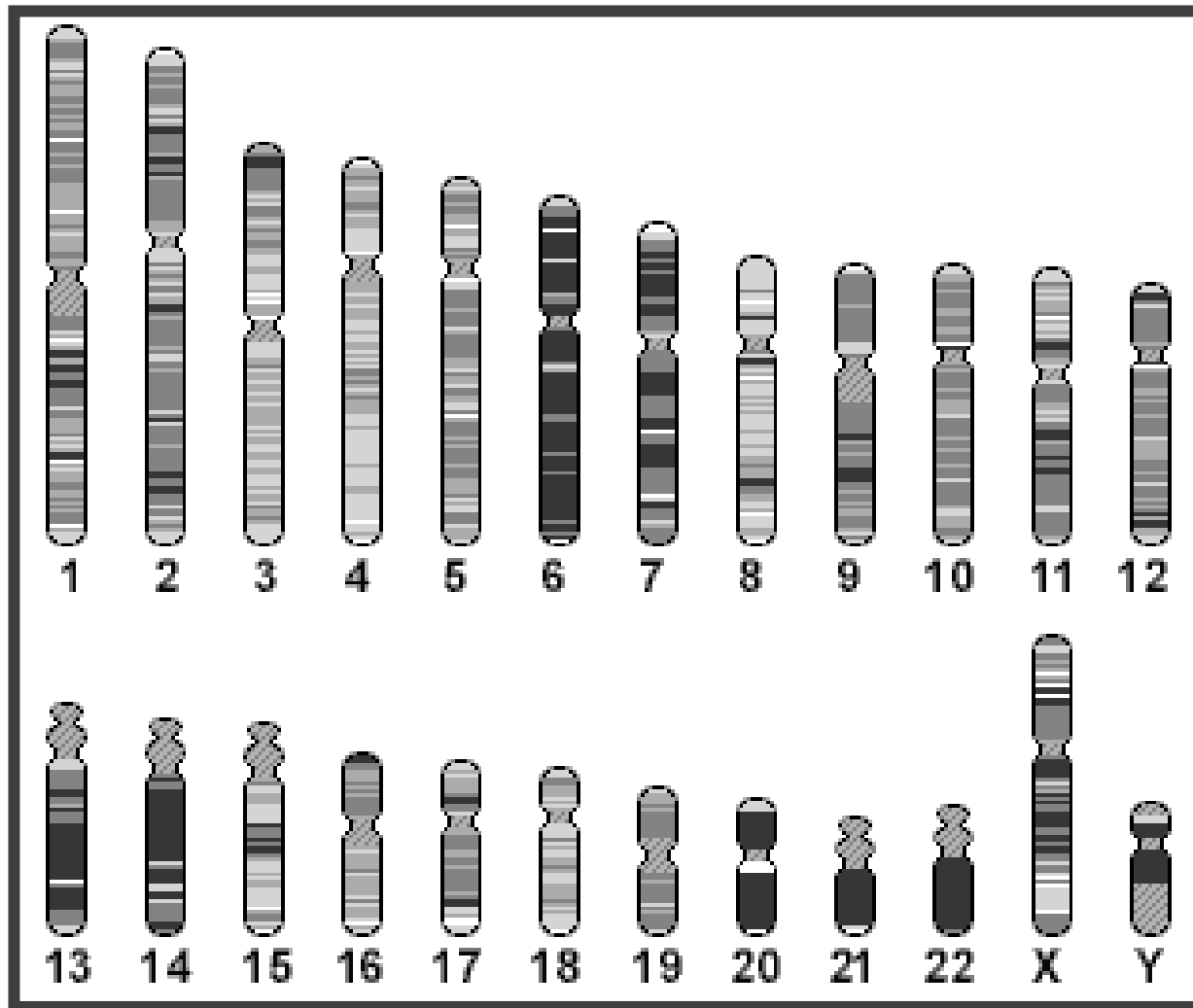
2000

news and views

The book of genes

Peter Little

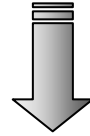
The sequence of human chromosome 22, now published, is the first phase in a biological revolution. Not least, the result will be a transformed appreciation of human individuality.



Def. genoma?

Genoma nuclear: 3000 mill de pb x 2

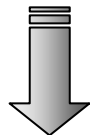
desarrollo de la Biología Molecular



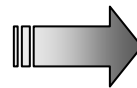
genes → estructura
→ secuencia
→ expresión
→ regulación



alteración de secuencia - cambio genotipo

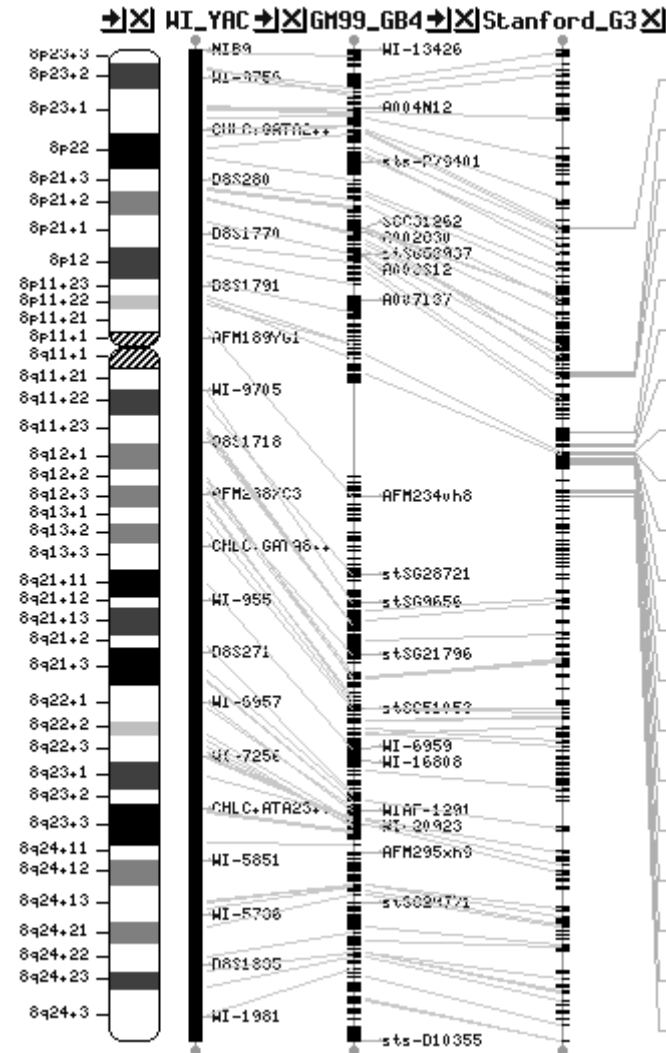
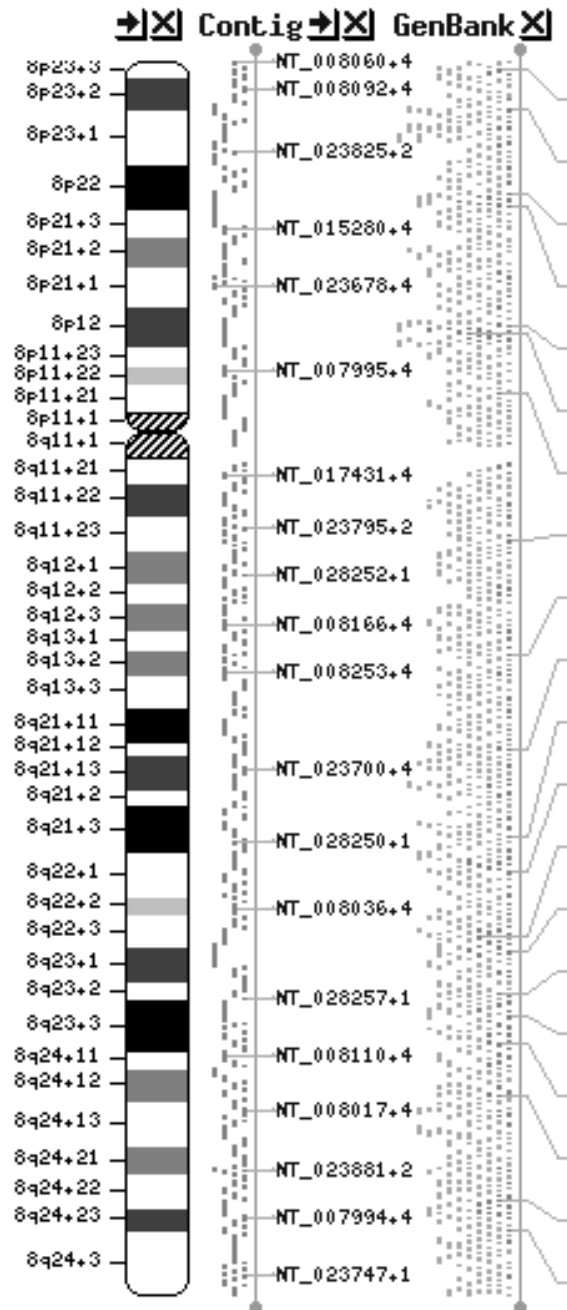


fenotipo clínico



**ALTERACION
MOLECULAR**

CROMOSOMA 8



genoma haploide: 3000 millones de pb

citogenética

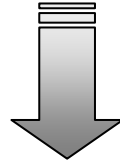
- cromosoma 1: 250 millones de pb
- cromosoma X: 150 millones de pb
- cromosoma 21: 50 millones de pb
- 1 banda: 10 – 20 millones de pb
- 1 sub-banda: 2 – 5 millones de pb

biol. molecular

- bacteriófago λ : 50.000 pb
- gen eucariota medio: 20.000 pb
- exón: 50 – 1.000 pb
- mutación puntual: 1 pb

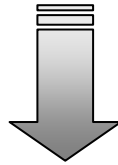
Solo evidenciamos la patología viable!!!

ADN nuclear



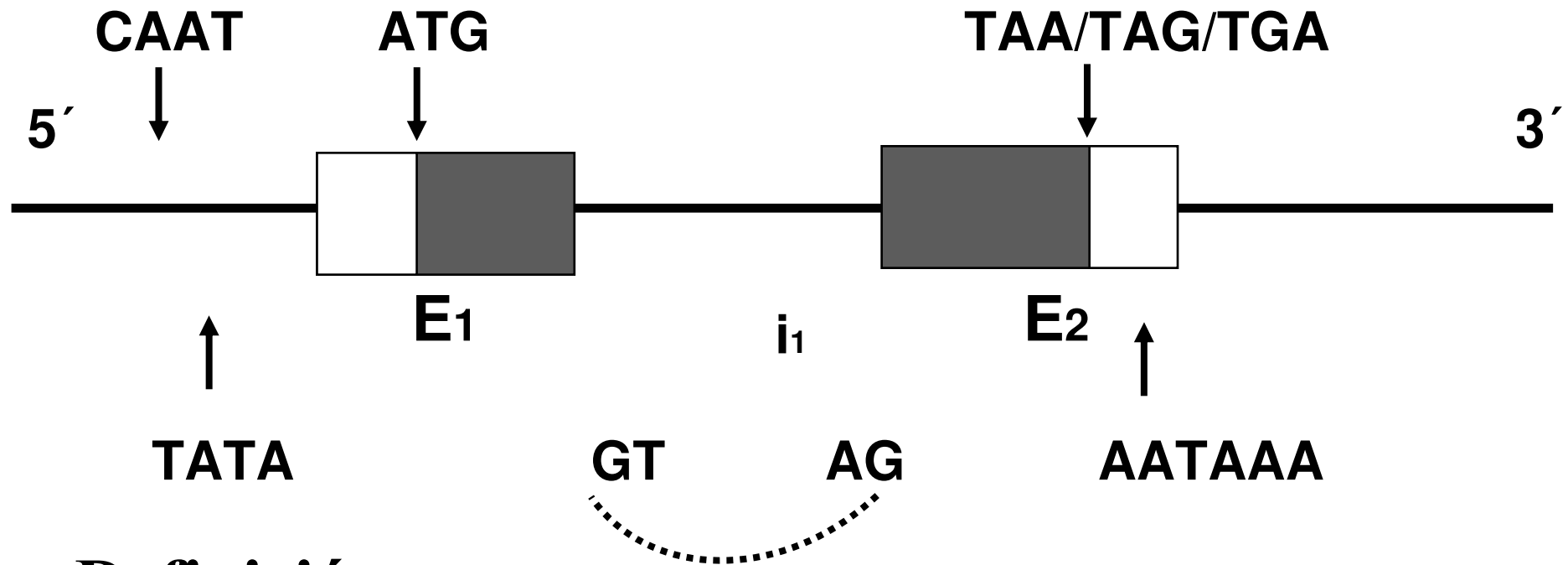
- genoma: 6×10^9 pb
- 23 pares de cromosomas
 - 44 autosomas
 - 2 sexuales
- 30 a 35.000 genes
- herencia mendeliana
- segregación meiótica

ADN mitocondrial



- genoma: 17.000 pb
- circular
- hasta 10 copias / mitoc.
centenares de mitoc. / cel.
- 37 genes
- herencia materna
- segregación mitótica

gen eucariota

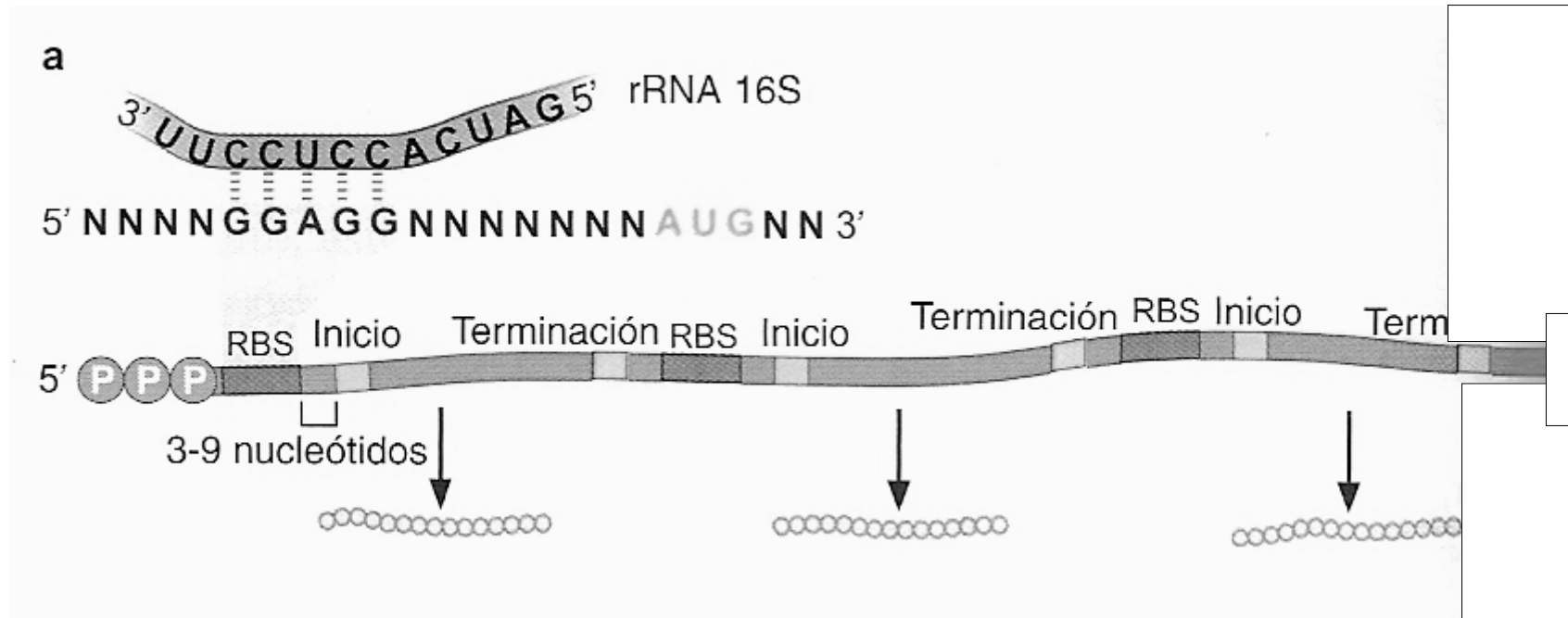


-Definición

-Tamaño

-Importancia de los intrones.

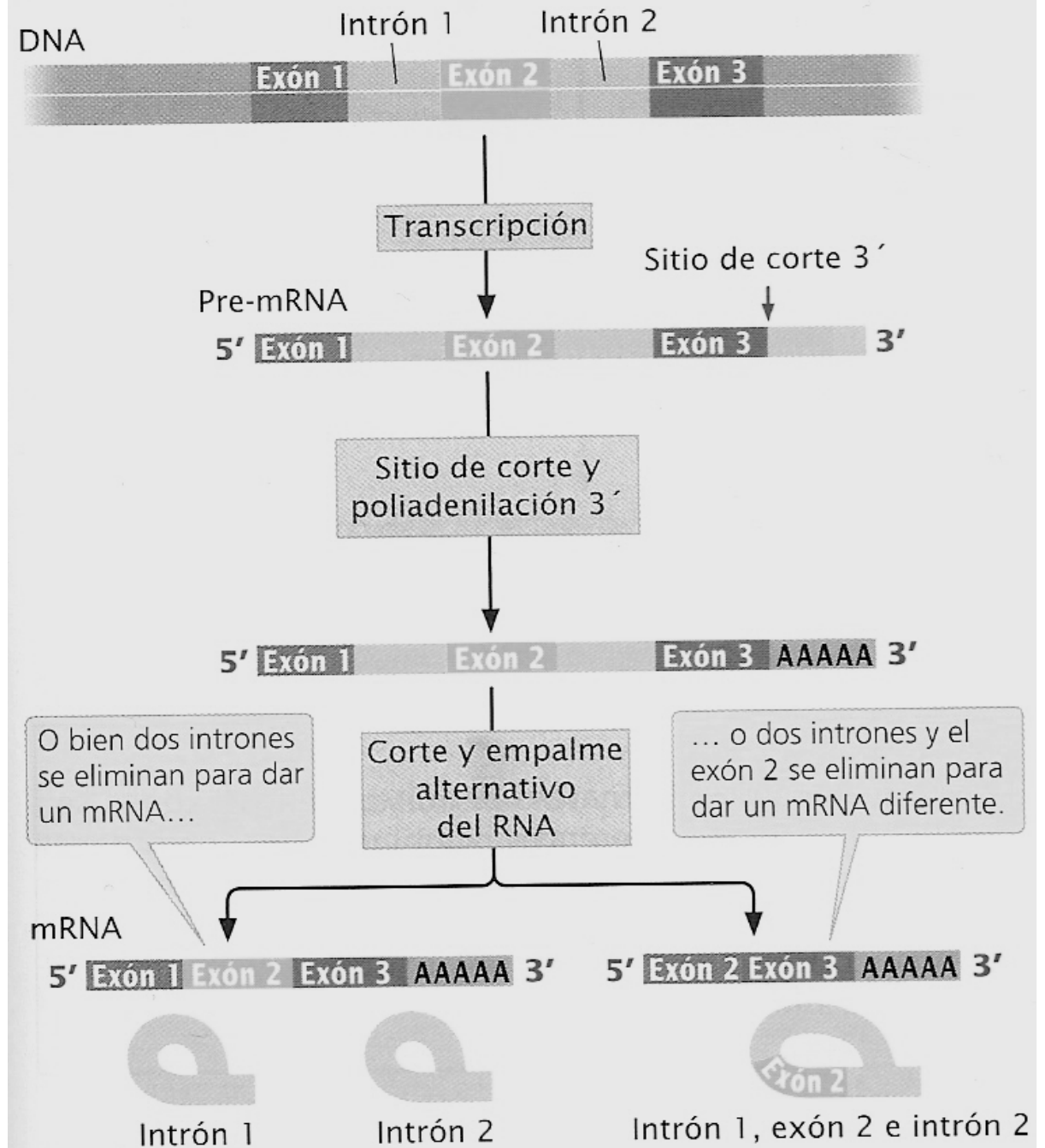
mRNA policistrónico procariota



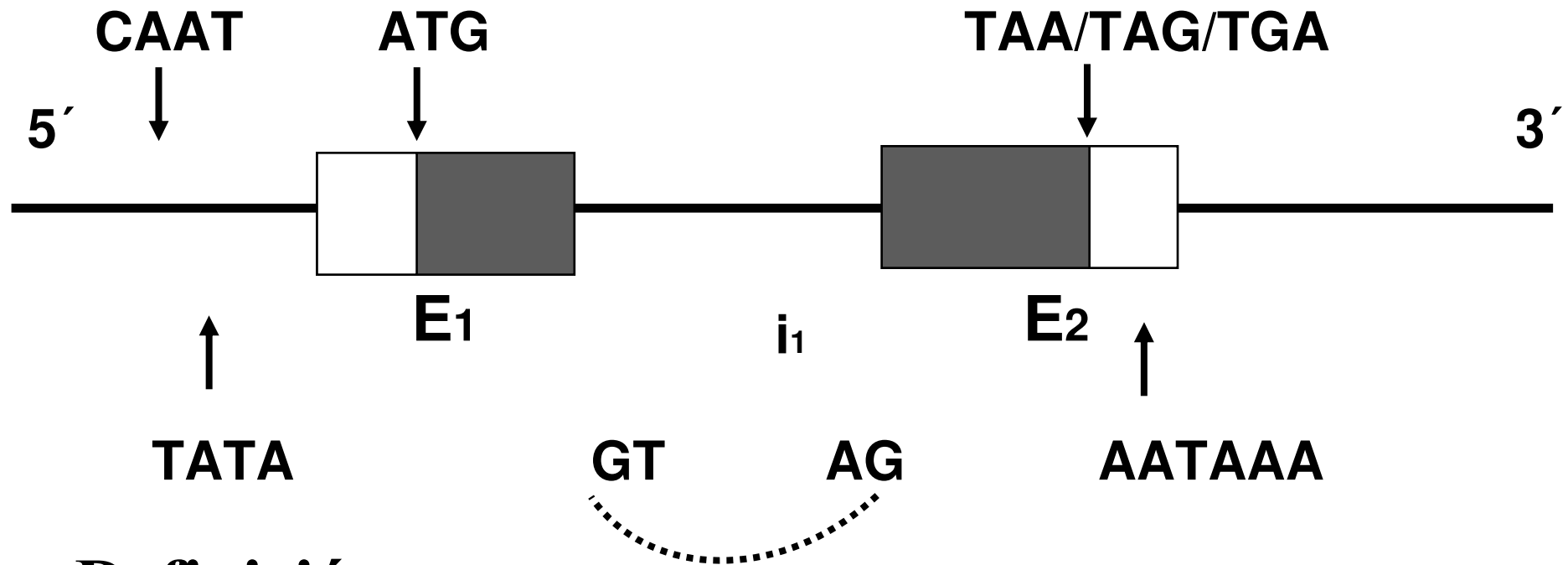
Los mRNA policistrónicos con frecuencia codifican proteínas que cumplen funciones relacionadas.

Splicing alternativo

(a) Corte y empalme alternativo



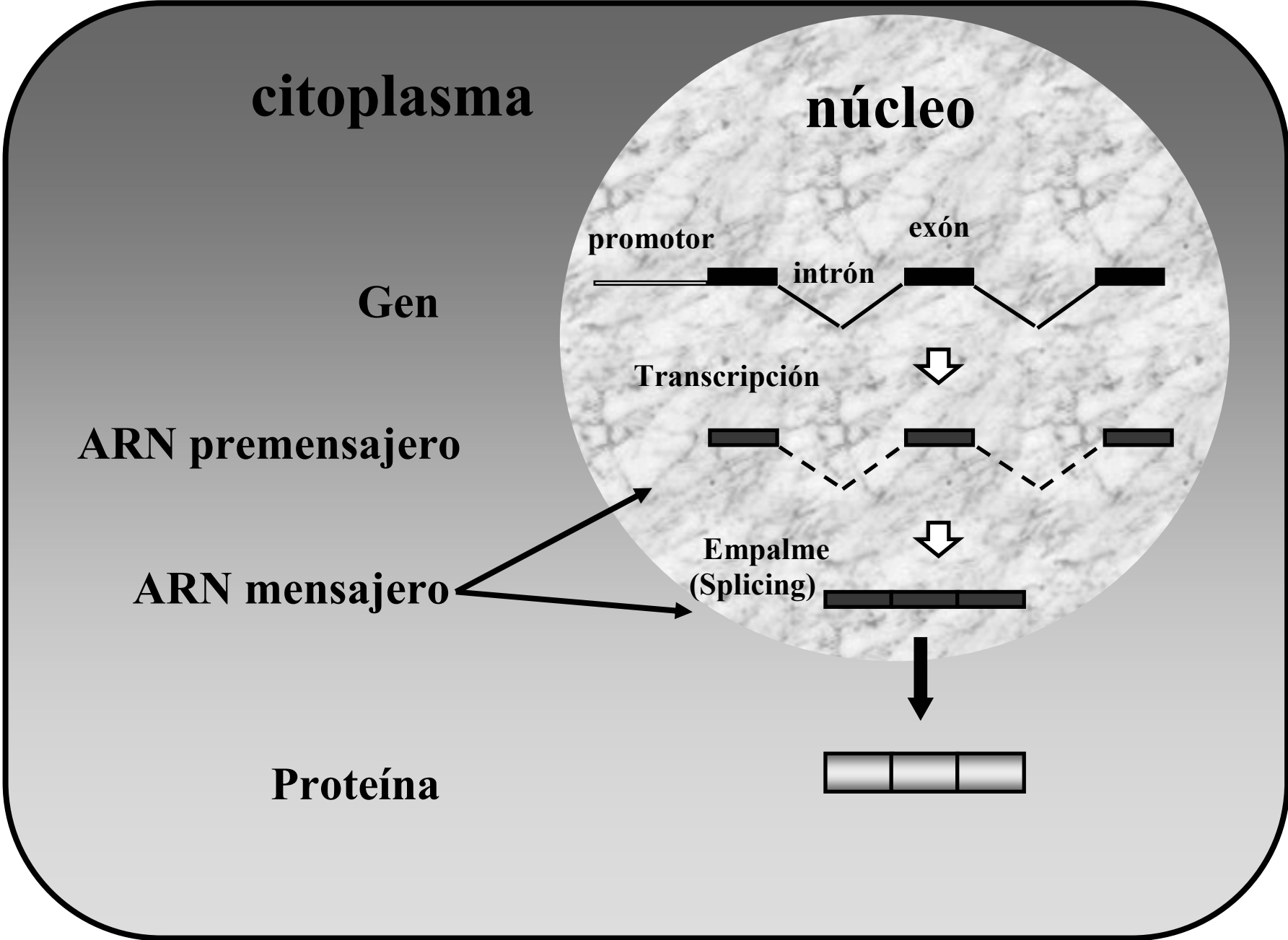
gen eucariota



-Definición

-Tamaño

-Importancia de los intrones.



MUTACION



Fidelidad y Estabilidad de la secuencia de ADN.

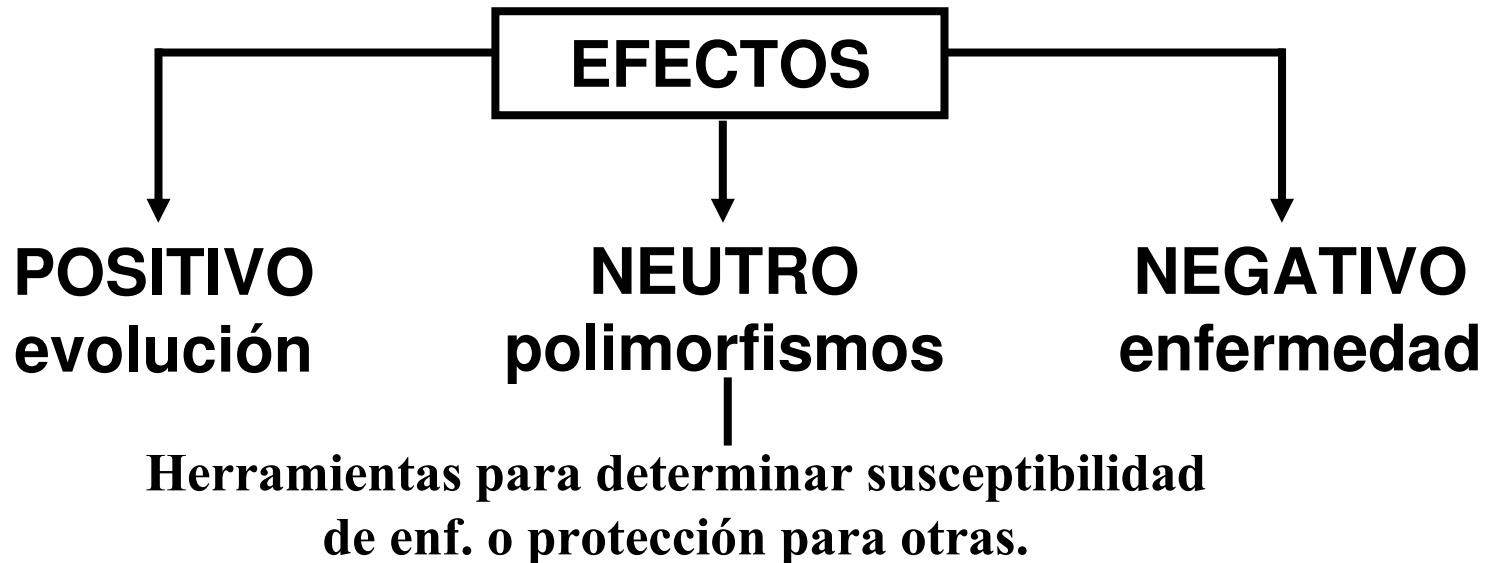
- El DNA es una molécula estable.
- La replicación, la reparación, la recombinación homóloga del ADN se producen con una gran fidelidad.
- Estos procesos aseguran que los genomas de un tipo de organismo sean casi idénticos de una generación a la siguiente.
- Sin embargo, cabe destacar que hay procesos genéticos que modifican la secuencia del DNA y así conducen a una estructura genómica más dinámica.

MUTACION

cambio en la secuencia de bases del ADN

↳ información codificada

↳ señales → expresión
→ maduración transcritos



Causas de Mutaciones

Mutaciones espontáneas ($10^{-6} - 10^{-11}$)

- **Errores durante la replicación**
- **Lesiones o daños fortuitos**
- **Elementos genéticos transponibles**

Mutaciones Inducidas

- **Agentes mutagénicos**
 - químicos**
 - físicos**

MUTACIONES

CLASIFICACION POR TAMAÑO



• **macrolesiones:** alteraciones cromosómicas

citogenética

-estructurales

-numéricas

• **microlesiones:** alteraciones génicas


biol. molecular

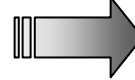
de megabases a

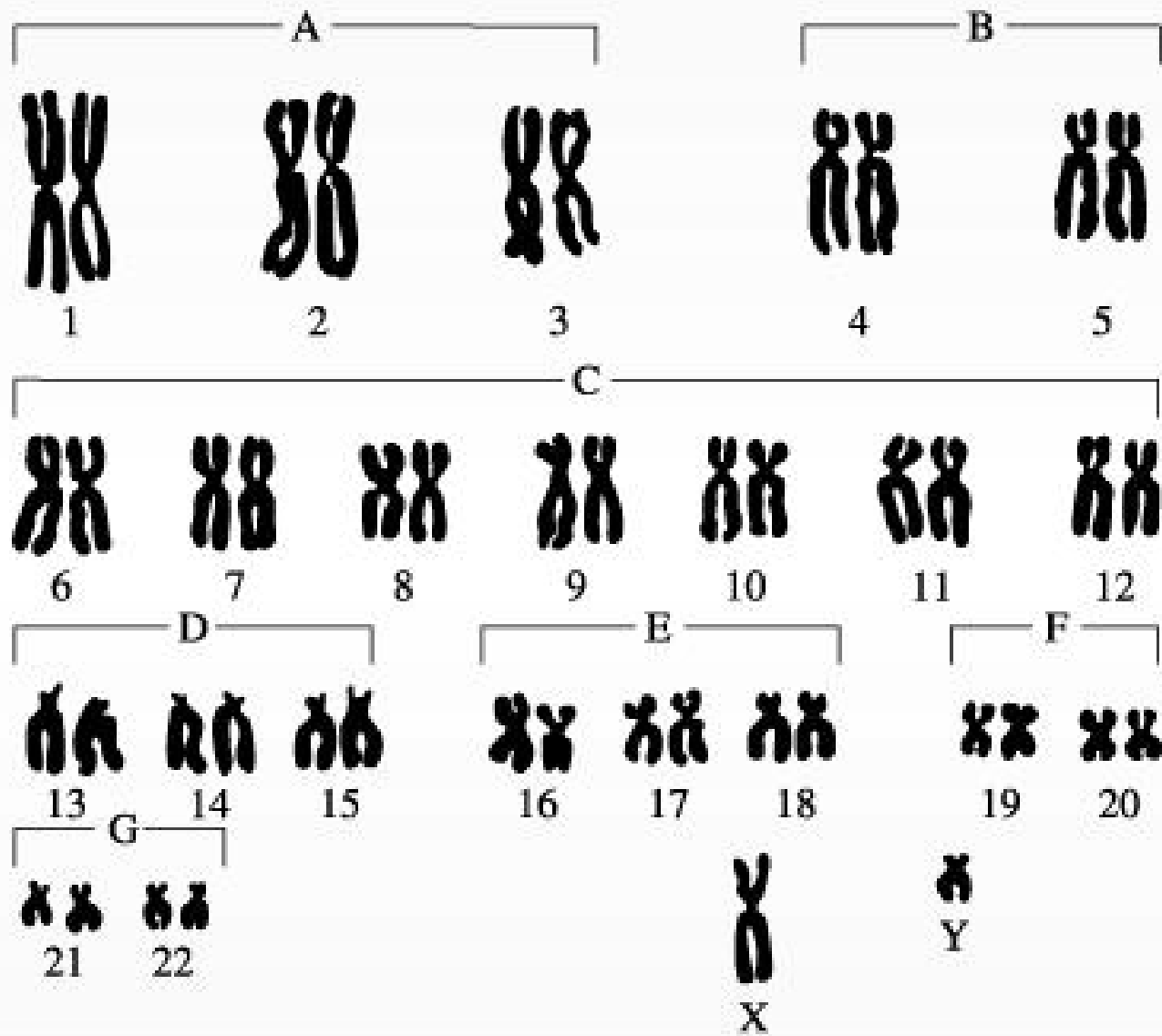
1 pb (mutación puntual)

MACROLESIONES

CAUSAS  accidentes meióticos o mitóticos

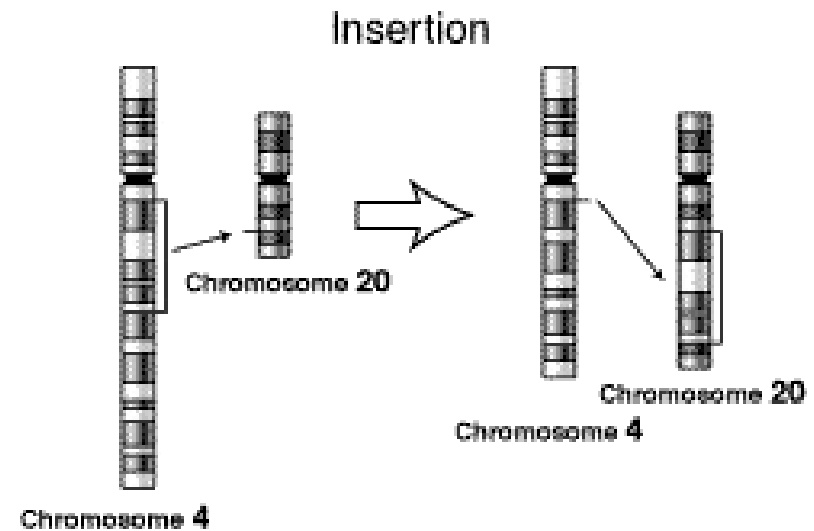
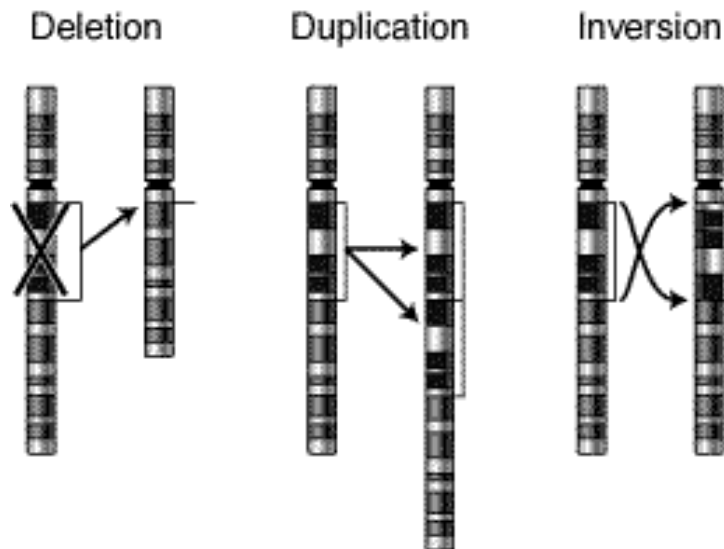
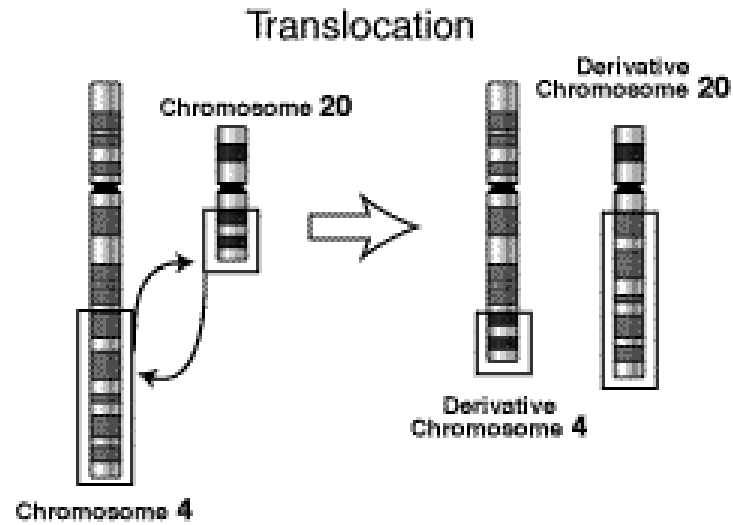
NUMÉRICAS  monosomía

 trisomía (ej. Trisomía par 21 (viable)).



ESTRUCTURALES

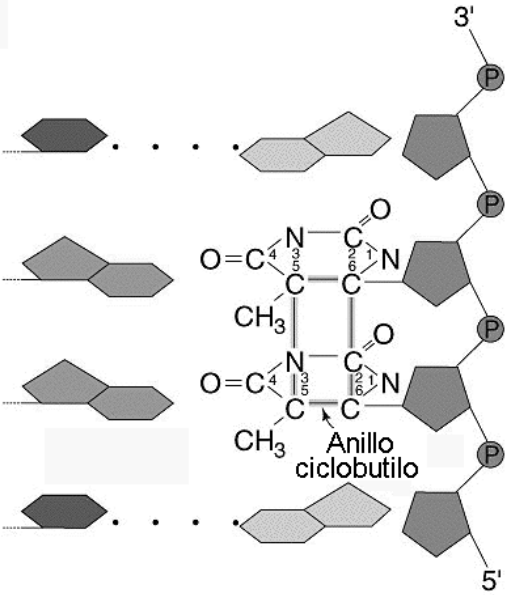
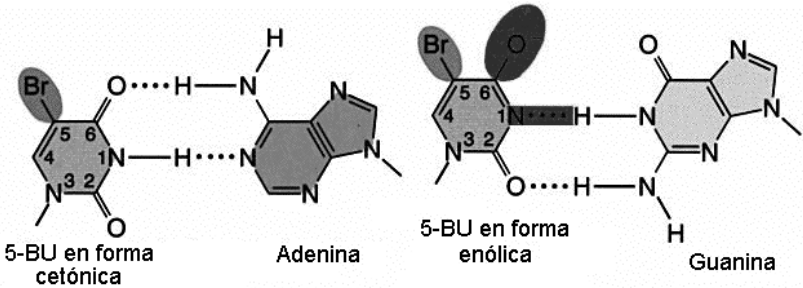
- ⇒ translocación
- ⇒ inserción / deleción
- ⇒ amplificación
- ⇒ inversión



MICROLESIONES

CAUSAS  agentes químicos y físicos

- Análogos de base
- Agentes alquilantes
- Agentes intercalantes
- Rayos X
- Radiación gamma
- Radiación UV



 errores en la replicación

MICROLESIONES

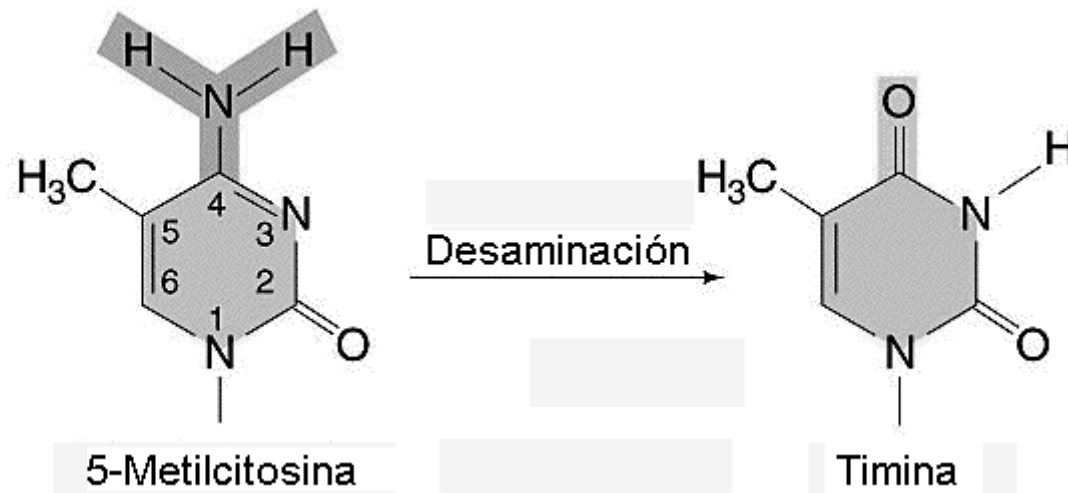
EFFECTOS  regiones codificantes

 regiones no codificantes

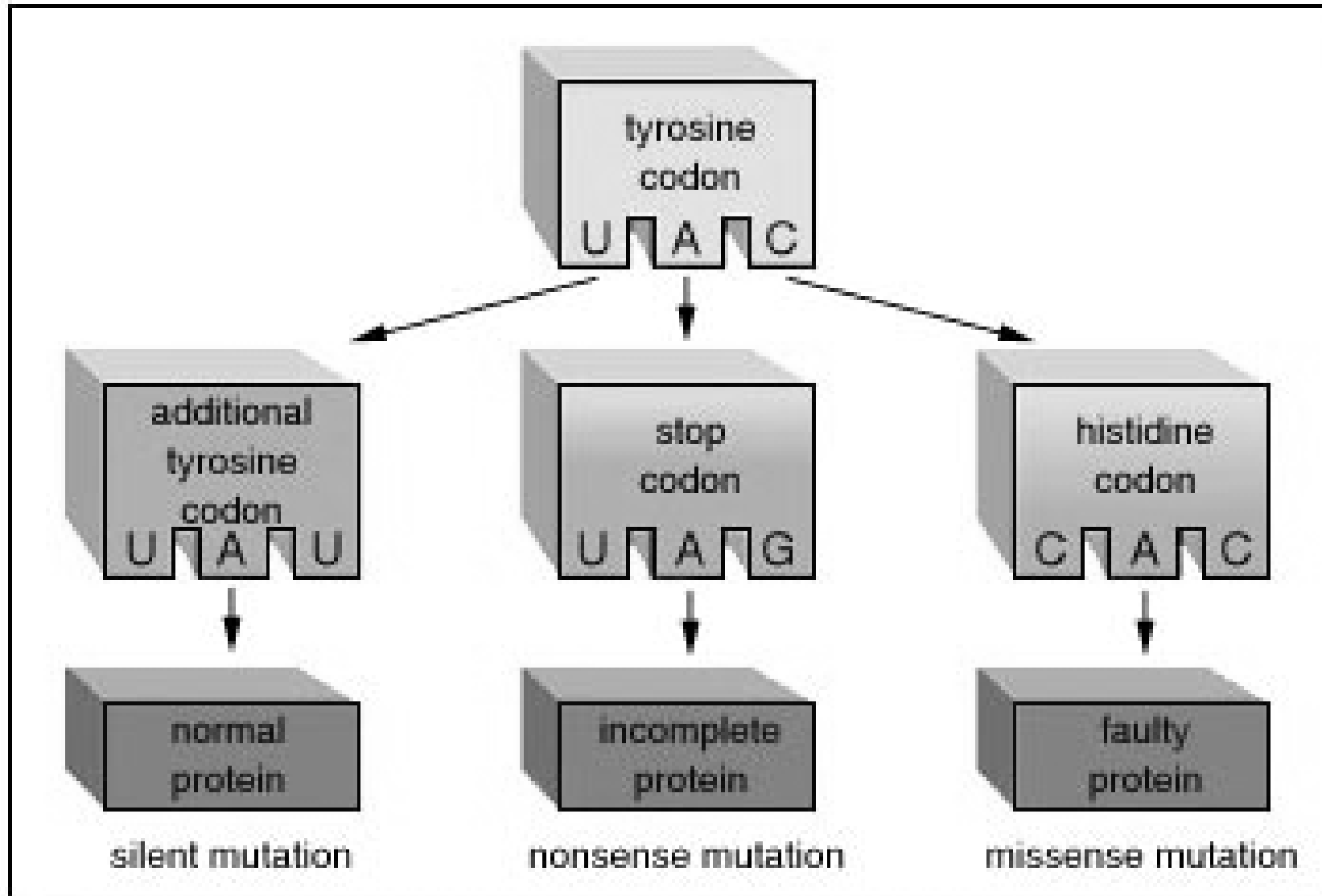
MICROLESIONES

Desaminación

CG A → TGA
R → Stop



Ej. de microlesiones: Mutaciones puntuales por sustitución en región codificante



MICROLESIONES

- delección: 1pb a genes completos

- inserción: incluyen duplicaciones

Cambio en el
marco de
lectura

- mutaciones dinámicas

Mutaciones que cambian el marco de lectura (Inserciones o deleciones)

Ej. Delección de un nucleótido

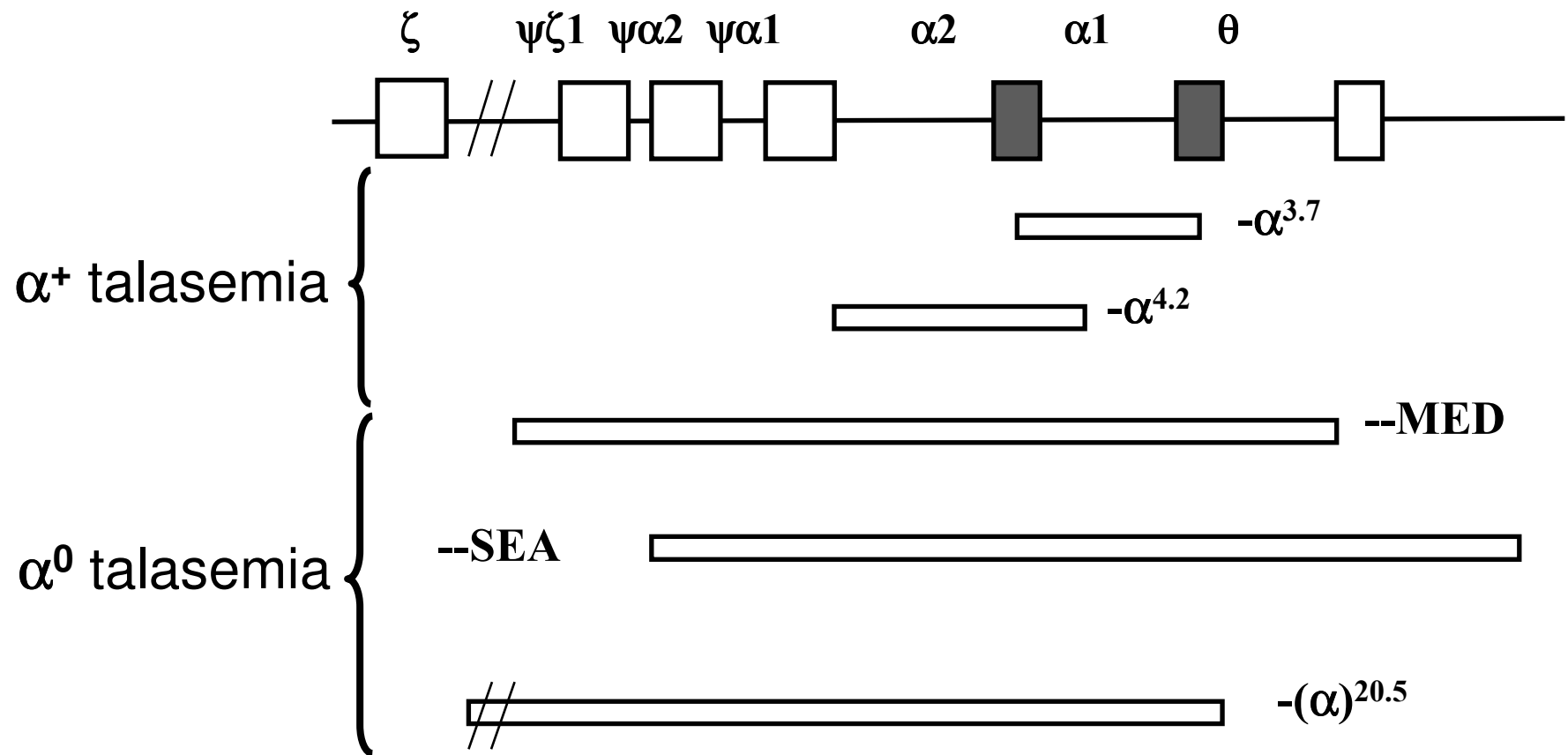
AAA TCA CTT GGC

Phe Ser Glu Pro

AAA ~~TCAC~~ TTG GCG

Phe Val Asn Arg

deleciones



mut. puntuales- región no codificante

- región promotora

región 5' no traducible

- splicing  sitio aceptor y dador

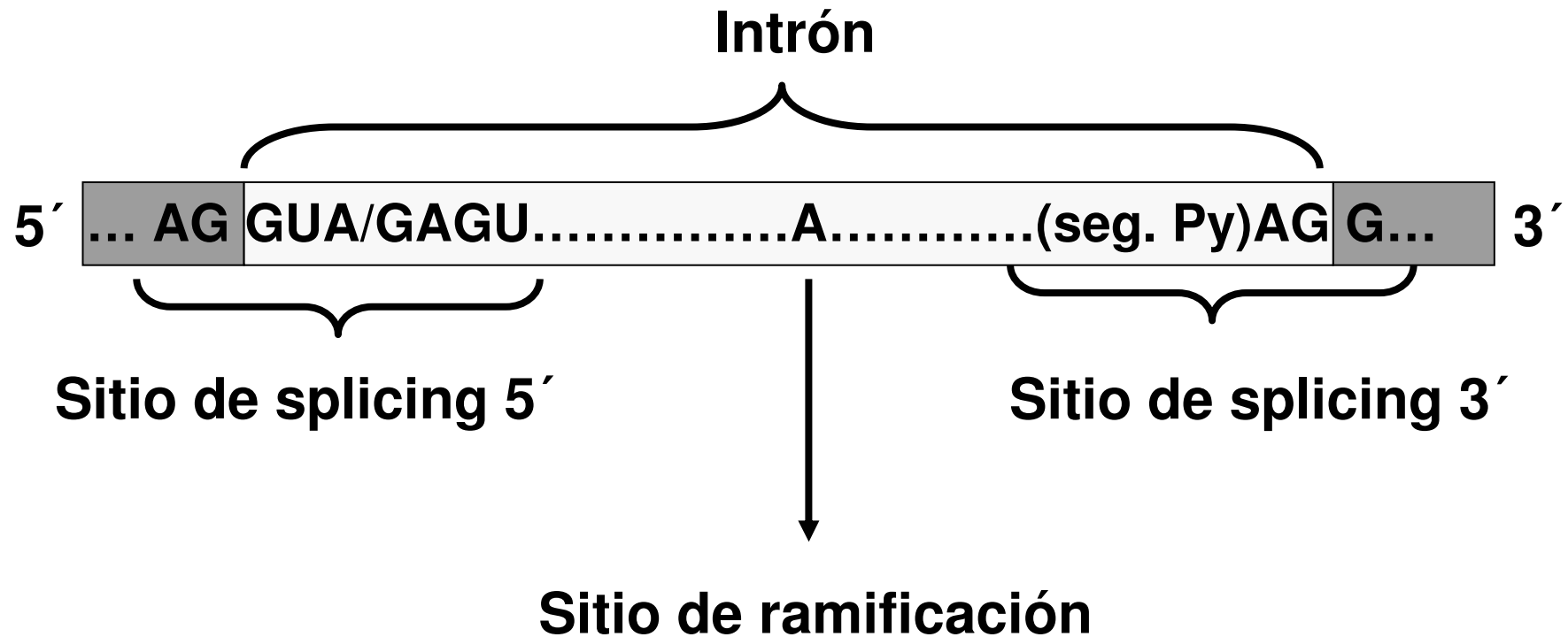
 sitios críticos  exónico

 intrónico

- señal de terminación

- señal de poliadenilación

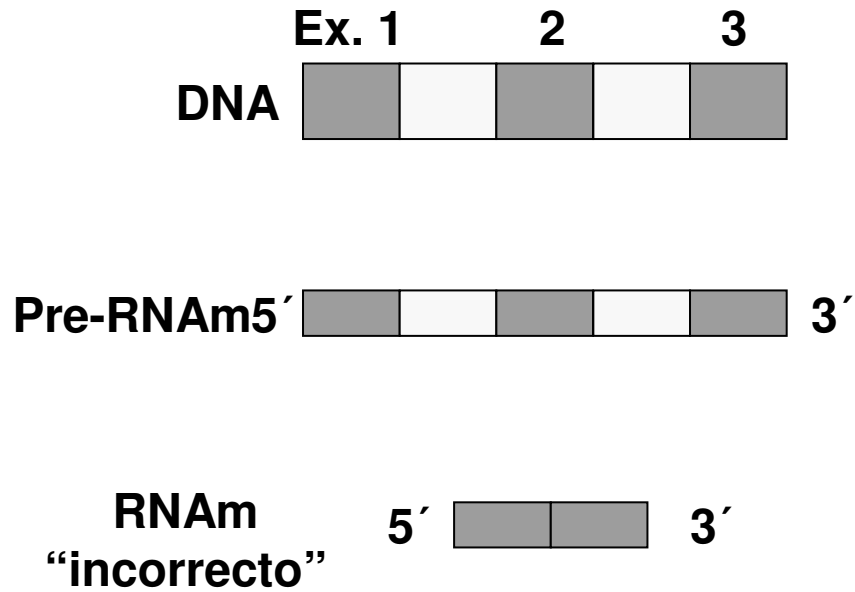
Química del Splicing



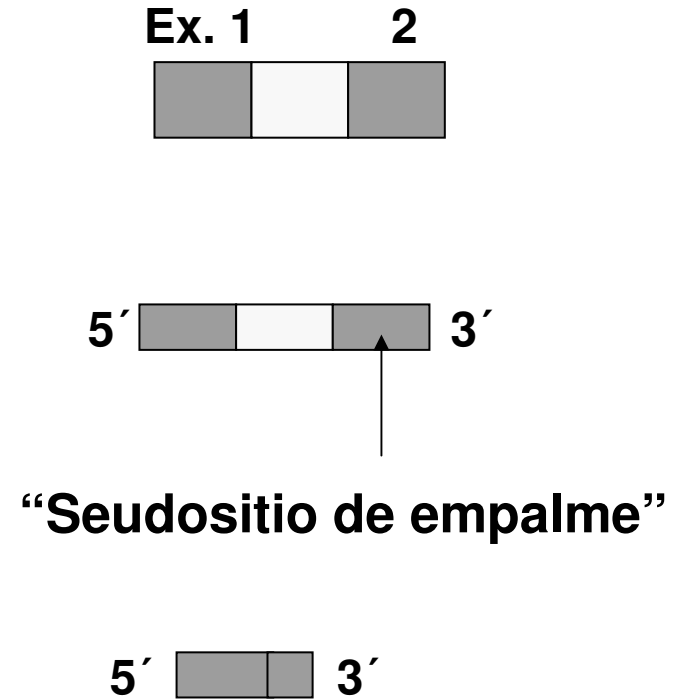
Secuencias dentro del RNAm determinan donde se produce el splicing.

Errores de splicing

Salteo exónico



Selección de pseudositio de splicing



mut. puntuales- región no codificante

- región promotora

región 5' no traducible

- splicing  sitio aceptor y dador

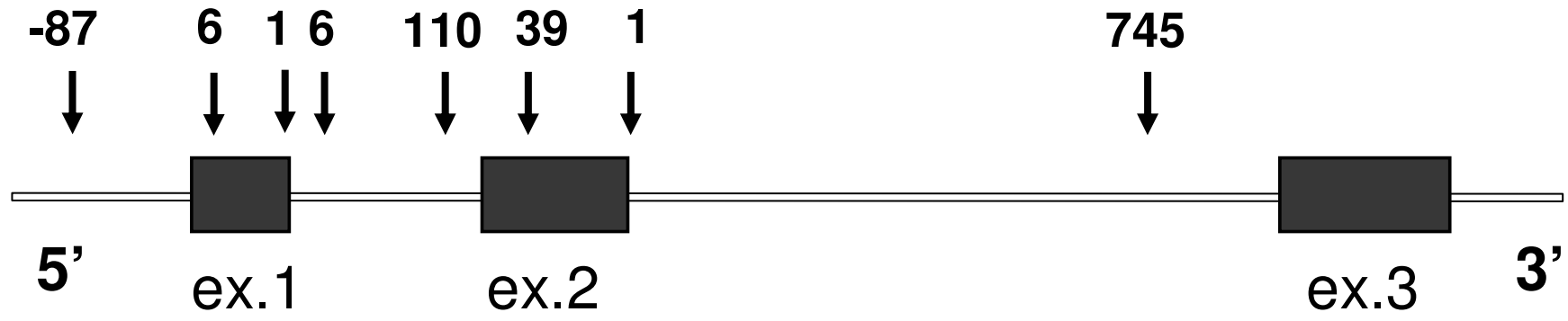
 sitios críticos  exónico

 intrónico

- señal de terminación

- señal de poliadenilación

Mutaciones puntuales en el gen de β -globina



codón sin sentido

delección de 1 b = cambio de marco de lectura

aceptor de splicing

sitio crítico de splicing

región promotora

CLASIFICACIÓN DE MUTACIÓN POR SU FUNCIÓN

pérdida de función

son las más frecuentes

distintas mutaciones  = fenotipo

ganancia de función

homogeneidad mutacional

 por acumulación (efecto tóxico)

 por interferencia con la proteína normal

MUTACIONES DINÁMICAS

- expansión de tripletes inestables

⇒ regiones no codificantes:

síndrome de X-frágil (gen FMR1) (CGG)_n

normal: $n < 50$, mutado: $n > 250$

⇒ regiones codificantes:

Corea de Huntington

expansión (CAG)_n → (glutamina)_n

normal: $n: 11$ a 26 , mutado: $n > 39$

Enfermedad de Huntington

- Dr. George Huntington en Long Island (1.872)
- origen en Nueva Inglaterra
- más de 1.000 casos
- comienzo: en adultos (40 ± 10 años)
- progresa por 15 a 20 años
- forma juvenil: comienza antes de los 20 años, trastornos de aprendizaje y movimiento, rigidez
- las nuevas generaciones tienen cuadros más graves o comienzo más precoz.**

Enfermedad de Hungtinton

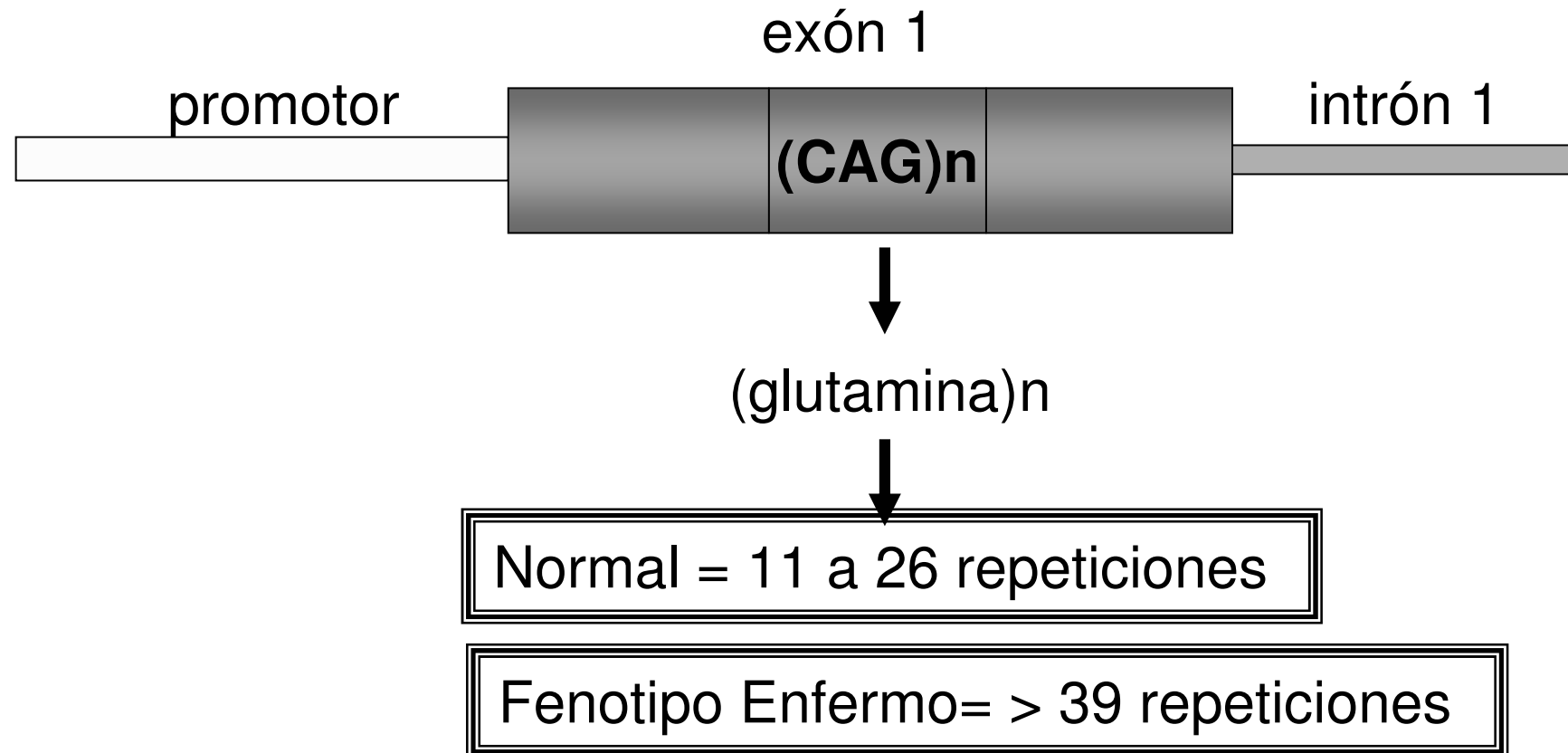
Clínica

- trastorno neurodegenerativo - demencia
- muerte neuronal selectiva y progresiva
- movimientos involuntarios
- deterioro de funciones intelectuales y disturbios cognitivos, episodios maníacos, tendencia suicida

Diagnóstico

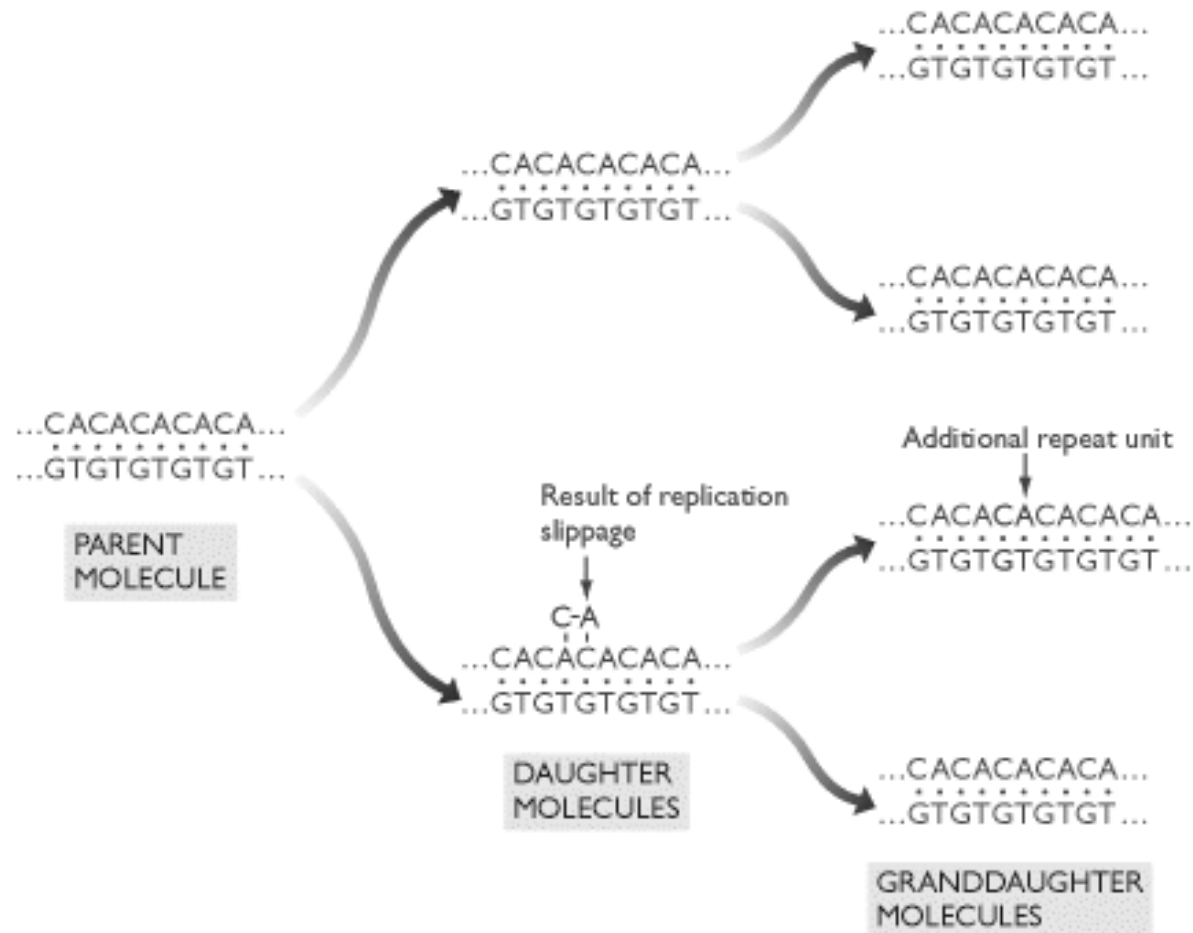
- Confirmatorio en pacientes.
- Puede elaborarse a corta edad, en la etapa presintomática, mayores de 18 años, en pacientes de riesgo .
- Problemas éticos.

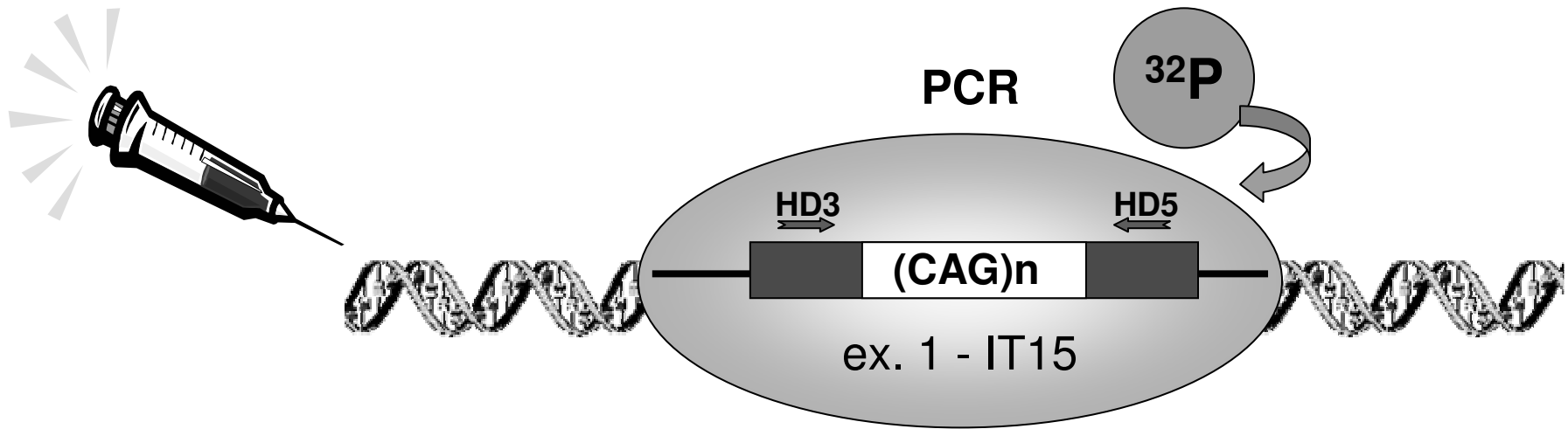
gen: IT15 o huntingtina (67 exones y 66 intrones)
350 kDa, 3144 aa



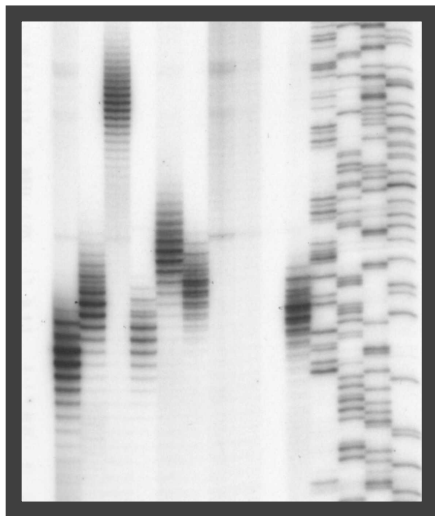
herencia: autosómica dominante

Errores en la duplicación por “Slipagge” de la polimerasa





radioautografía

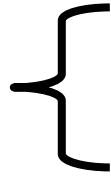


electroforesis

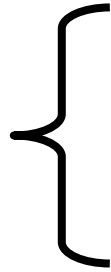


GACT

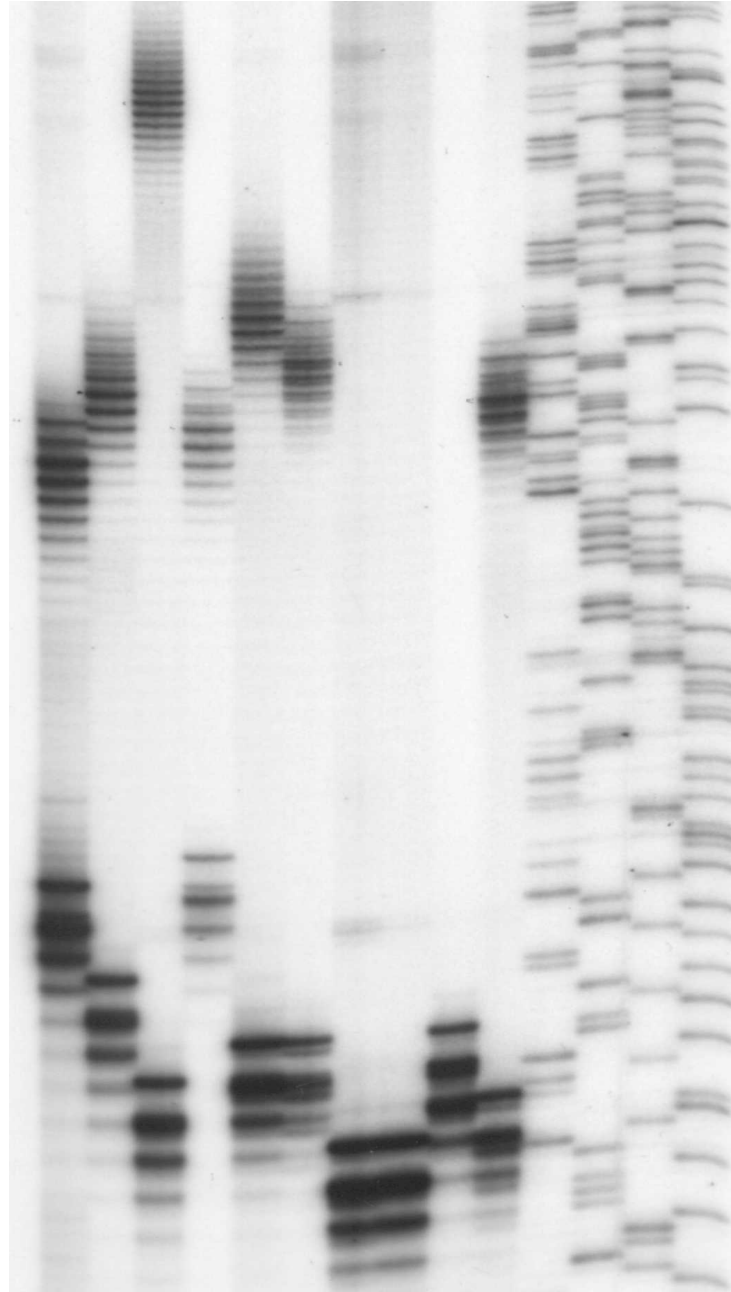
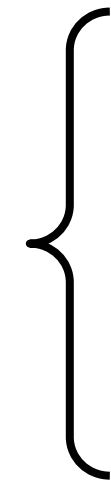
(CAG) n = 66

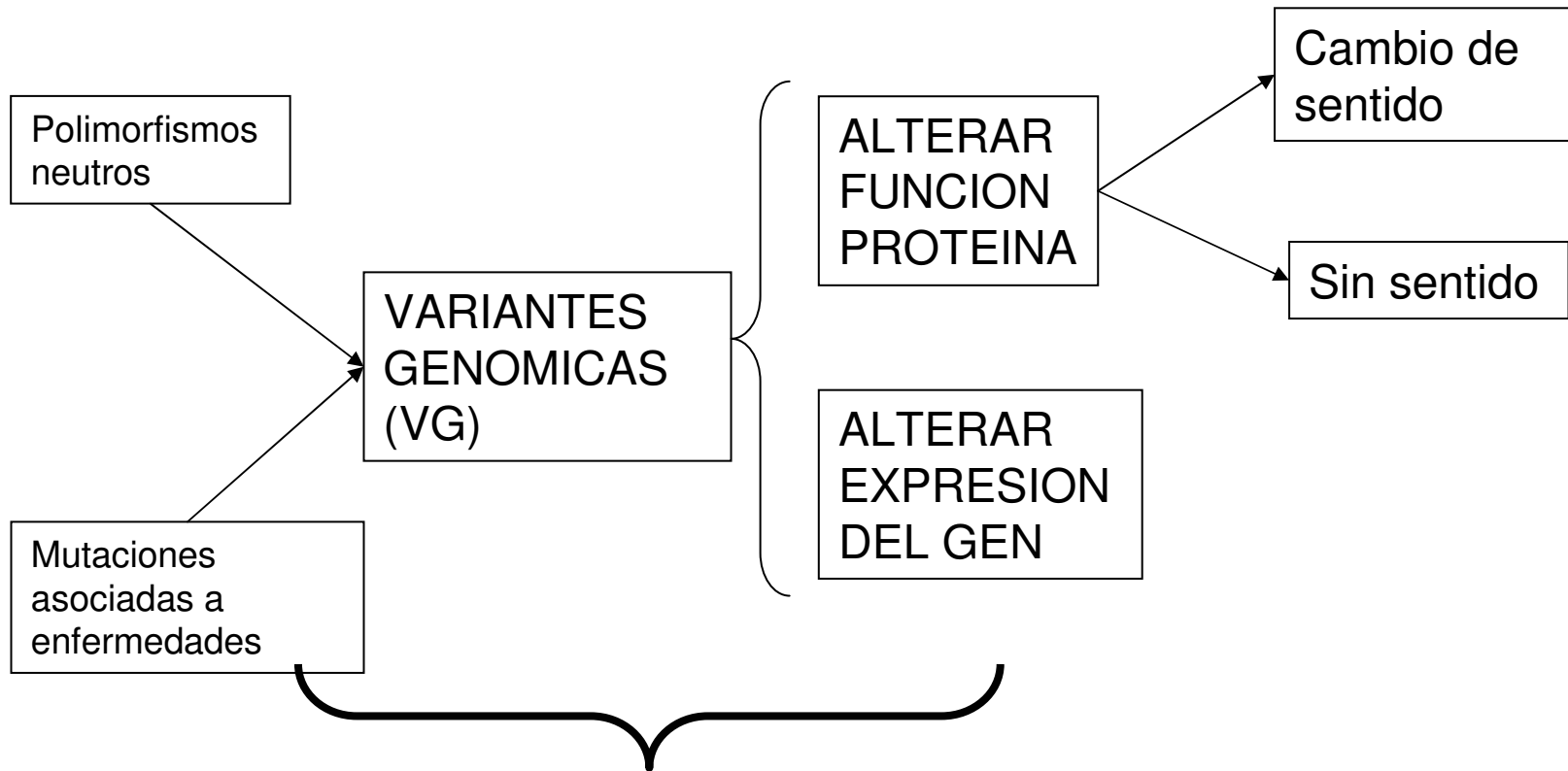


(CAG) n = 41 a 50



(CAG) n = 14 a 23





MUTAGENESIS IN VITRO SITIO DIRIGIDA

Técnica mediante la cual se puede introducir una mutación definida in vitro, en una secuencia de ADN clonado

CLASIFICACION DE ENFERMEDADES GENETICAS



FACTORES GENETICOS

FACTORES PREDISPONENTES



ALTERACION MOLECULAR



FACTORES DESENCADENANTES

FACTORES AMBIENTALES

PATOLOGÍA MOLECULAR

•PATOLOGÍAS HEREDITARIAS

- ◆AUTOSOMICAS**
- ◆LIGADAS AL CROMOSOMA X**

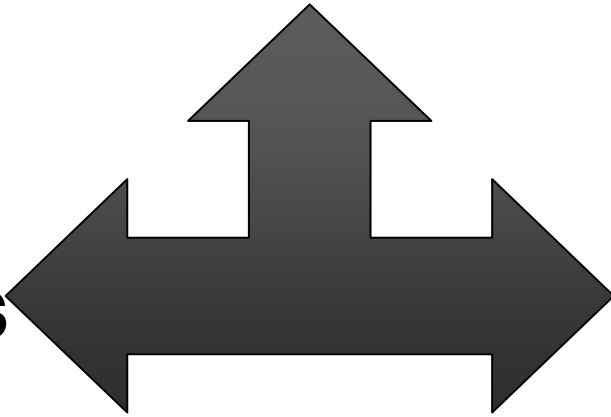
Familiares
“De Novo”

•PATOLOGÍAS NO HEREDITARIAS

- ◆SOMATICAS**

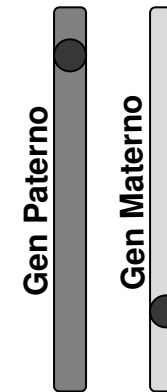
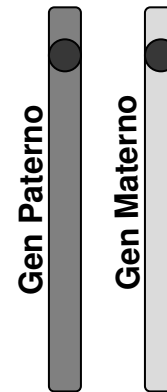
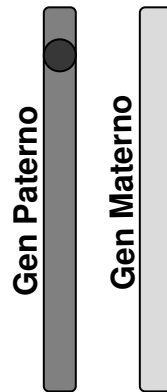
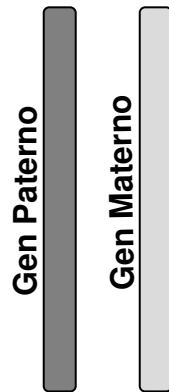
• PATOLOGÍAS HEREDITARIAS

Dominantes



Recesivas

PATOLOGÍA HEREDITARIA RECESIVA



genotipo



Homocigota

Heterocigota

Homocigota

Doble Heterocigota

fenotipo



Normal

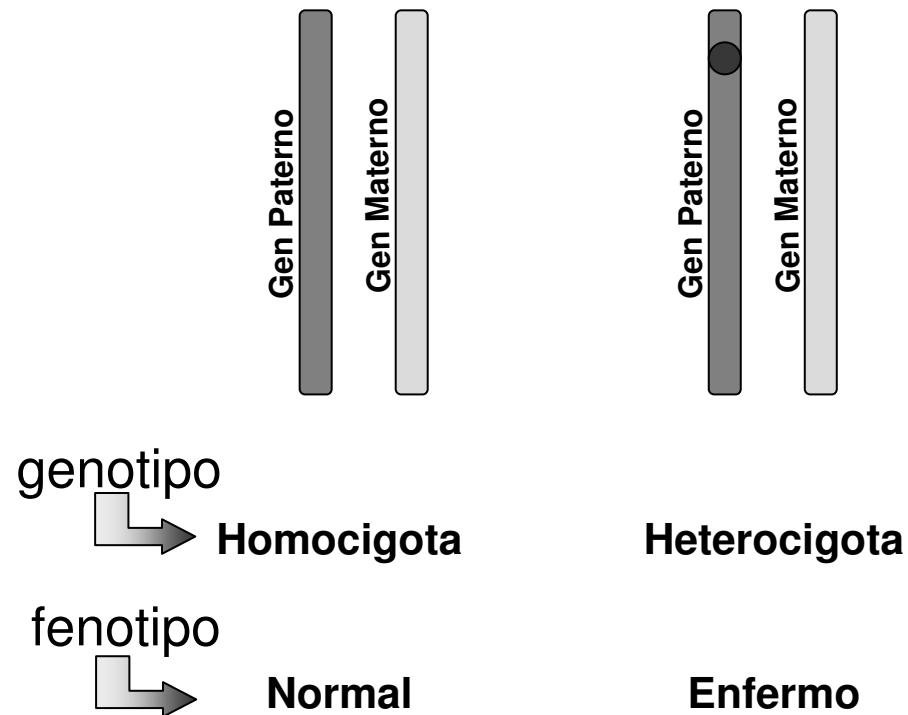
Normal – Portador!!!

Enfermo

Enfermo

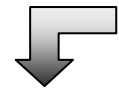
● : Mutación

PATOLOGÍA HEREDITARIA DOMINANTE

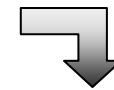


● : Mutación

PATOLOGÍA HEREDITARIA



AUTOSÓMICA



dominante

enf. Huntington

poliquistosis renal

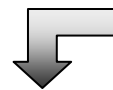
ataxia espinocerebelosa

recesiva

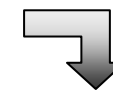
fibrosis quística

talasemia mayor

fenilcetonuria



LIGADA AL CROMOSOMA X



dominante

hipofosfatemia

recesiva

daltonismo

hemofilia A, B

X- frágil

PATOLOGÍA HEREDITARIA

MONOGÉNICAS

◆ monoalélicas

drepanocitosis

defecto de α 1- anti tripsina

◆ polialélicas

hemoglobinopatías

fibrosis quística

Distrofia Muscular de
Duchenne / Becker

COMPLEJAS

diabetes mellitus

hipertensión arterial

ateroesclerosis

esclerosis múltiple

PATOLOGÍA HEREDITARIA

ADN mitocondrial

- poco frecuentes

- mutaciones puntuales

atrofia óptica de Leber

genes de ARNt: ej. lisina y leucina

- rearrreglos complejos

miopatía mitocondrial

encefalomiopatía

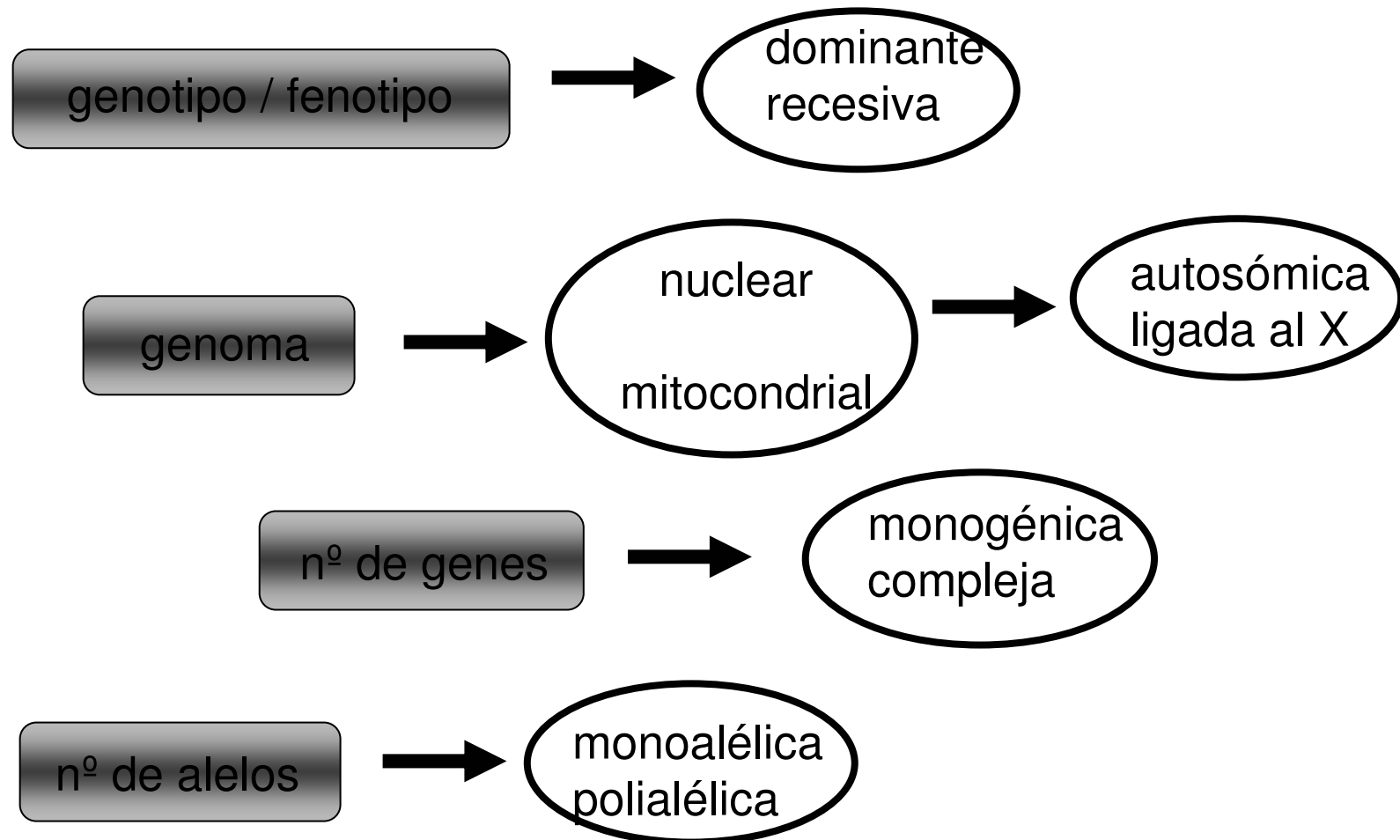
episodios de acidosis láctica

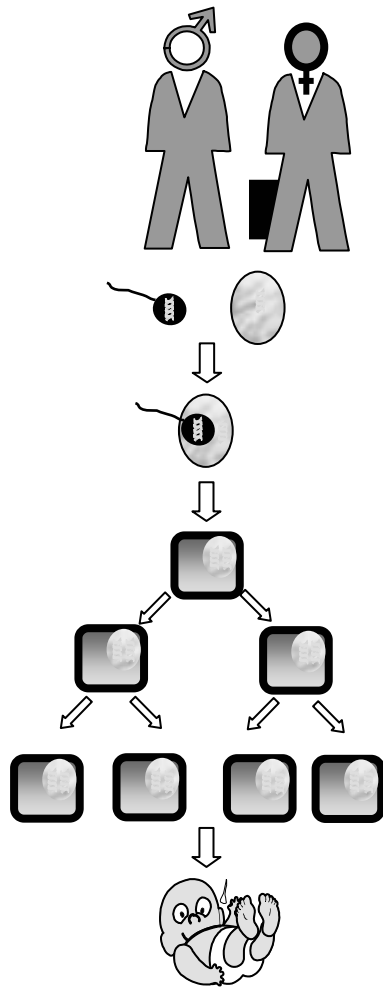
PATOLOGÍA MOLECULAR

resumen

HEREDITARIA

SOMÁTICA





DIAGNOSTICO MOLECULAR



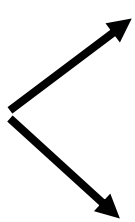
DIAGNOSTICO MOLECULAR

Objetivo:

Búsqueda de variaciones de secuencia en el ADN

-asociadas o no a patología.

-en regiones



codificantes

No codificantes

DIAGNOSTICO MOLECULAR

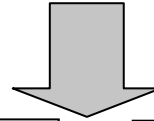
Etapas:

- Identificar el gen**
- Identificar mutaciones en los individuos con la patología**
- Determinar la frecuencia de mutaciones en la población**
- Armar un sistema de diagnóstico útil para la patología de interés.**

Para qué sirve conocer el gen implicado en una enfermedad?

Gen mutado identificado

Mejor comprensión de la enfermedad



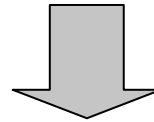
Posibilidad de diagnóstico

Posible tratamiento



En pacientes asintomáticos, sintomáticos o prenatalmente, búsqueda de mutación en otros miembros de la familia y consejo genético.

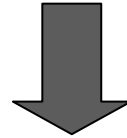
Terapia convencional más racional
Terapia génica y modelos animales para desarrollo de tratamientos.



Implicancia en el pronóstico, calidad de vida

Situación 1

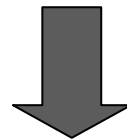
Gen asociado a patología ya caracterizado



Analizo el ADN de pacientes con la patología.

Situación 2

Gen asociado a patología NO caracterizado



Identifico gen asociado

Estrategia General para la identificación de genes asociados con enfermedades.

Situación 2a

Se conoce la proteína



Proteína purificada



Clonar el gen



Situación 2b

NO se conoce la proteína



Análisis de ligamiento



Identificación región cromosómica



Gen candidato



Búsqueda de mutaciones



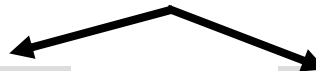
Probar que la mutación causa la enfermedad

Clonación funcional

Defecto bioquímico conocido



Aislamiento de la proteína, Proteína purificada y secuenciada



Producción de anticuerpos

Sondas de ADNc



Identificación de clones + a partir de genotecas.



Caminata cromosómica para caracterizar el gen.



Búsqueda de mutaciones en individuos afectados

Clonación posicional

Defecto bioquímico desconocido



Sin datos cromosómicos



Búsqueda de ligamiento (linkage)



Encontrar ligamiento a marcadores polimórficos



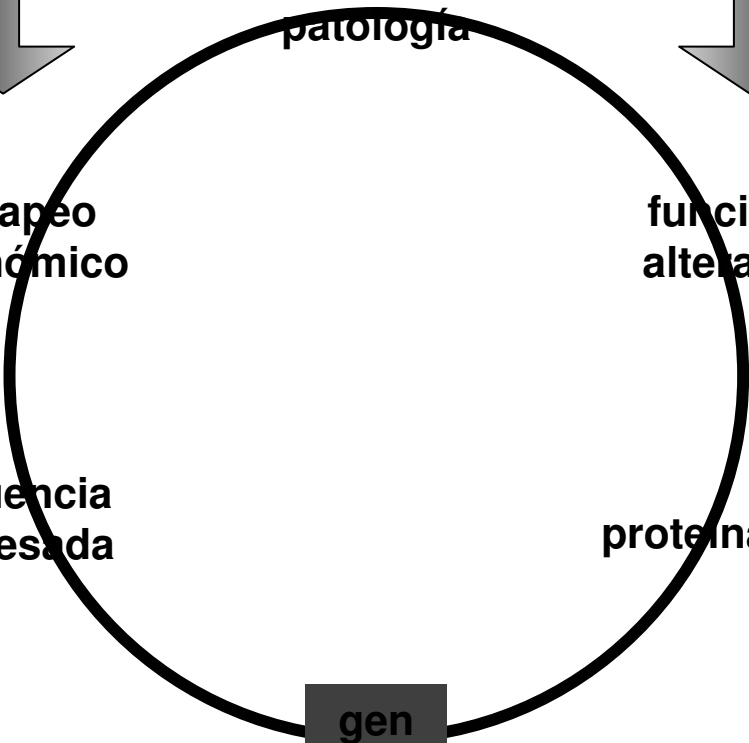
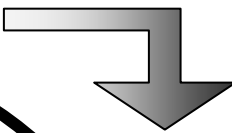
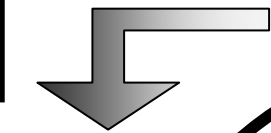
Situar el gen lo más precisamente posible preferentemente con menos del 1 % de recombinación.



Situar el gen en un punto concreto de un cromosoma.

**GENÉTICA
INVERSA**

**GENÉTICA
CLÁSICA**



tratamiento

diagnóstico

diagnóstico

**terapia
génica**

gen



Marcadores moleculares

Características

- Se conoce la precisa ubicación en el genoma
- Polimórficos

Tipos

- SNP**: Cambio de base única
- RFLP**: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción.
- VNTR**: Número Variable de Repeticiones en Tandem
Minisatélites y Microsatélites

Armado de un sistema de diagnóstico

Cuál es la utilidad de un estudio de ADN?

Qué tipo de muestra necesito y en qué condiciones?

Qué técnica de diagnóstico voy a realizar?

Qué cantidad de ADN necesito?

Qué técnica de purificación de ácidos nucleicos voy a desarrollar?

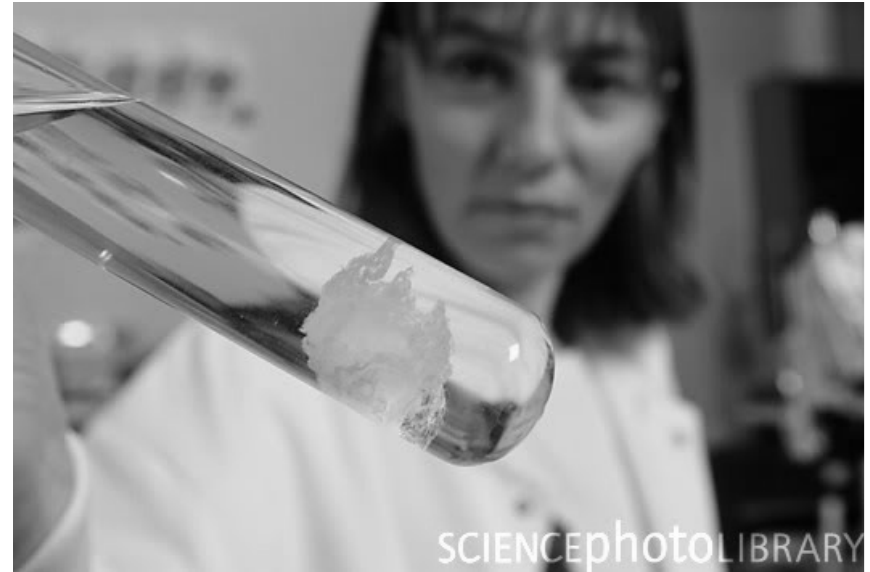
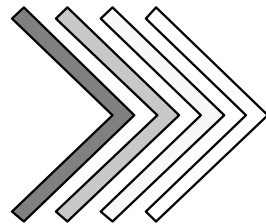
Purificación de ADN

cél. nucleada (ADN)

diploide: 6 pg (6×10^{-12} g)

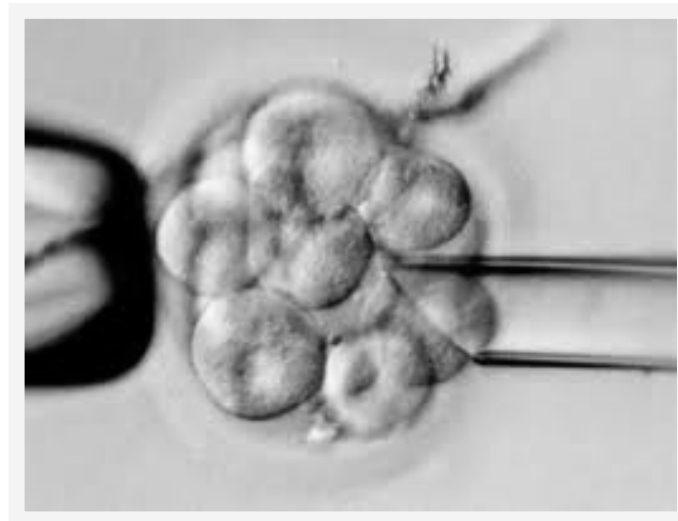
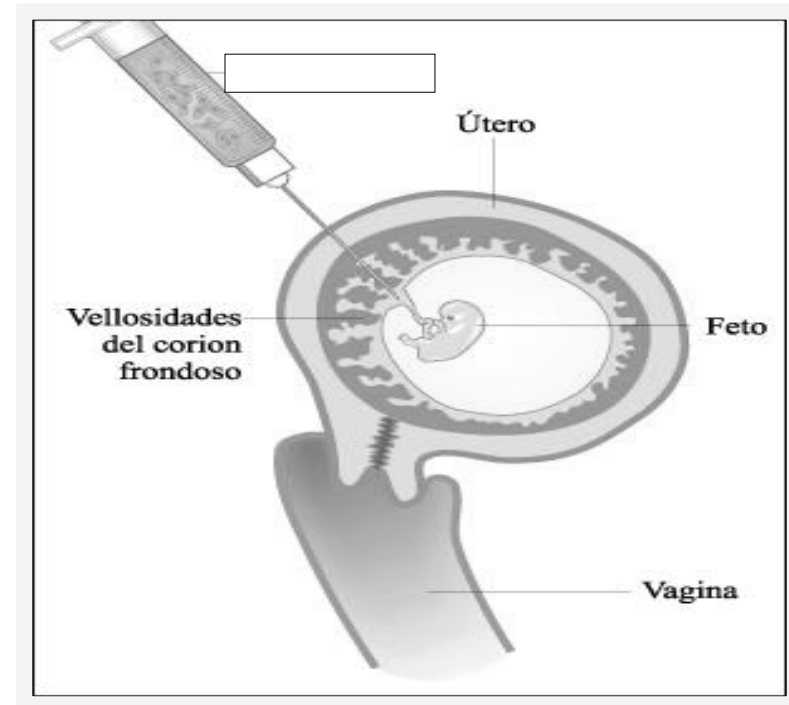
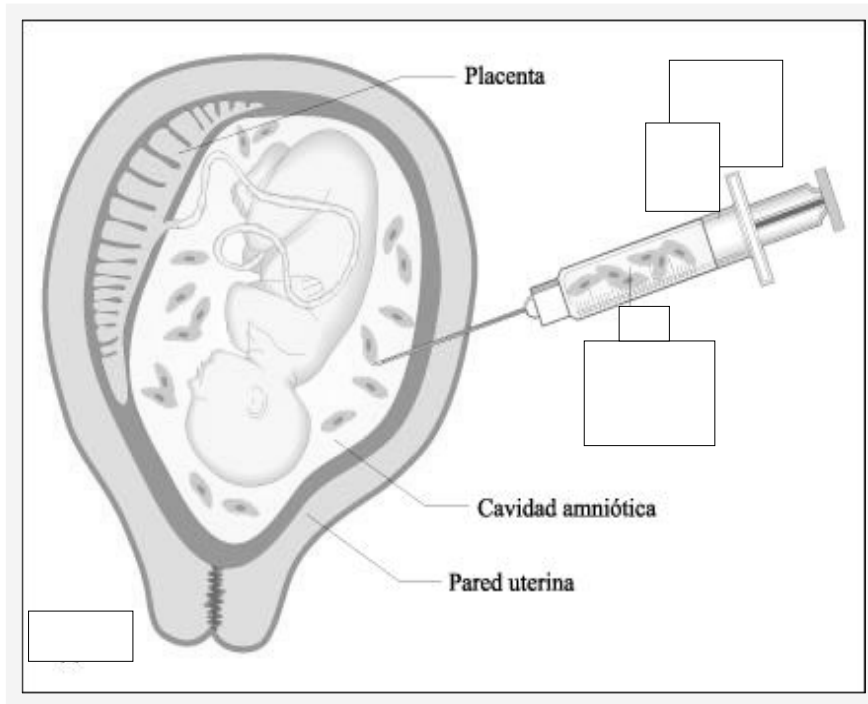
135.000 cél. diploides

1 μ g de ADN



genoma diploide: 6×10^9 pb

Consejo genético a nivel de células embrionarias.



TECNICAS MOLECULARES



Estrategia

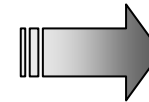
gen

mutación

diagnóstico

caracterizado

conocida

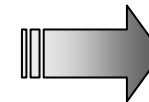


directo

Caracterizado

no caracterizado

desconocida



indirecto

Diagnóstico directo

tamaño de la mutación

- grandes mutaciones

(Southern Blot)

- pequeñas mutaciones

(PCR + técnicas complementarias)

•Diagnóstico indirecto



- análisis de RFLP

- identificación de STR o VNTR

SOUTHERN BLOT



SOUTHERN BLOT

hibridación
específica



SONDA
PRIMERS

corte
específico



ENDONUCLEASA
DE RESTRICCIÓN

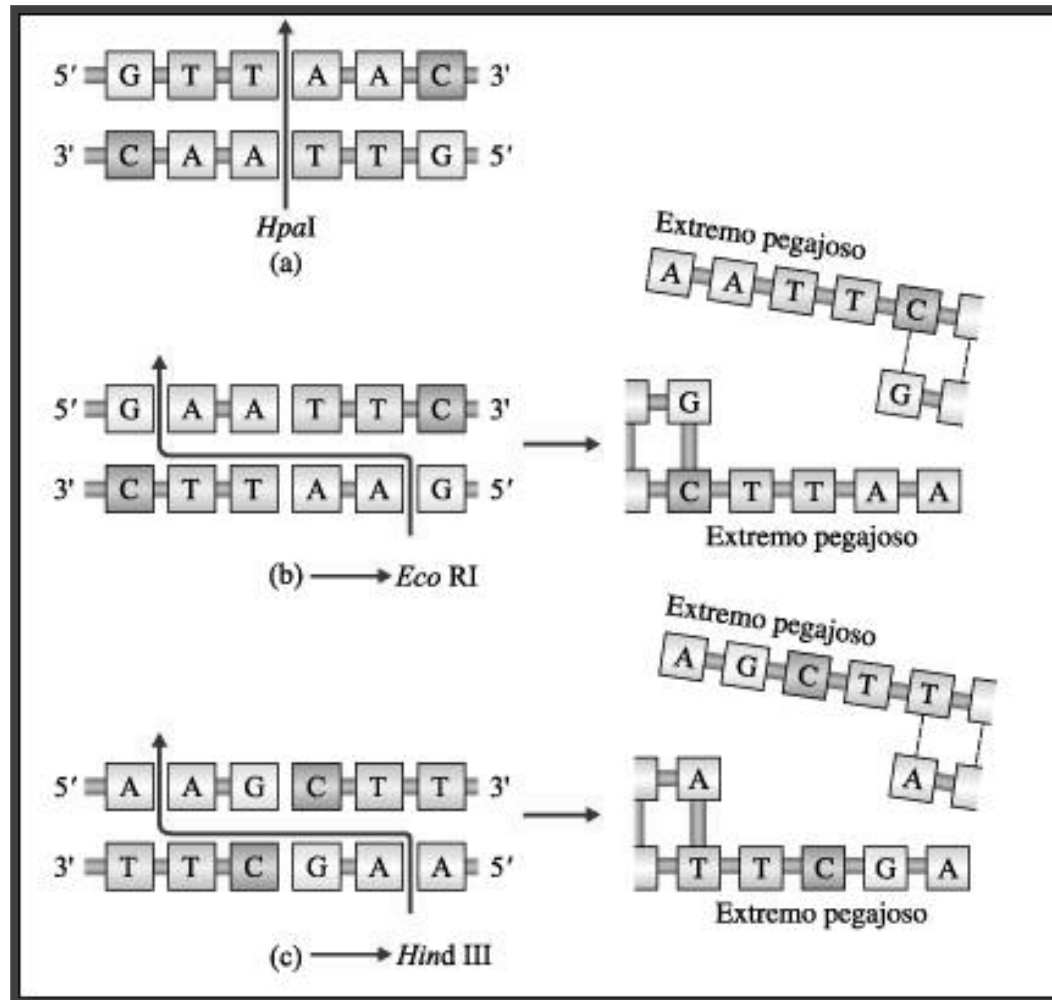
sonda

- ADN o ARN
- por lo menos 15 nucleótidos
- homóloga a ADN o ARN
- se hibrida en forma estable y específica
por reasociación de bases complementarias

tipos de
sondas

- ADN genómico
- ARN → ADN complementario
- oligonucleótidos sintéticos

endonucleasa de restricción

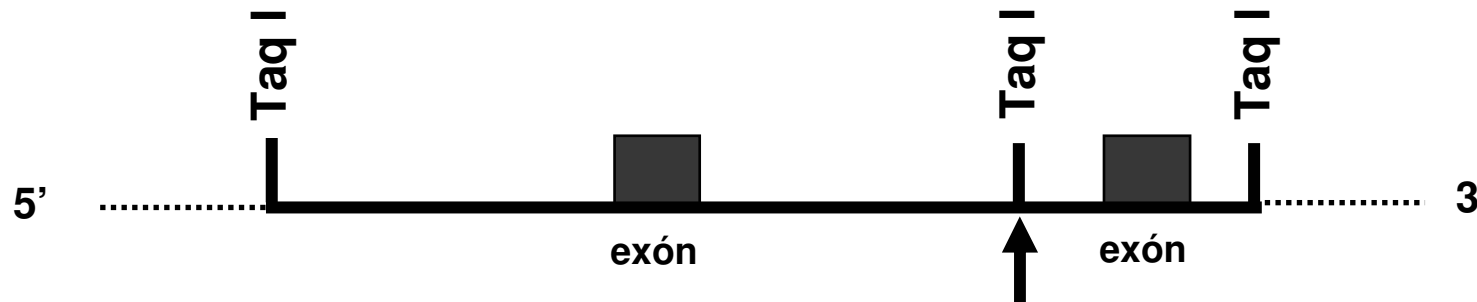


endonucleasa de restricción

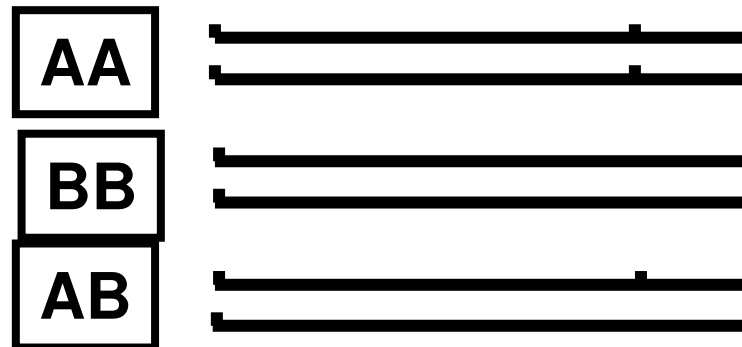


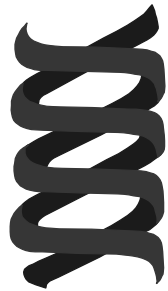
alelo A: 11,0 y 3,5 Kb

alelo B: 14,5 Kb

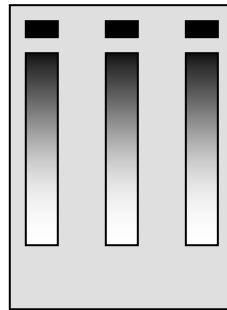


Genotipos

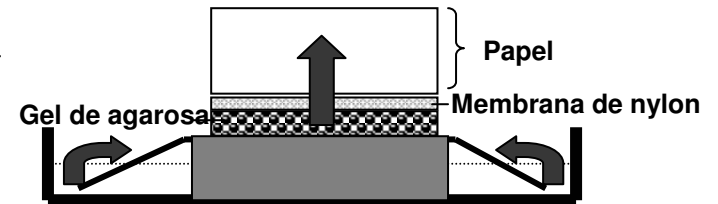




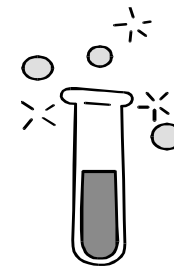
Purificación del ADN
Corte con ER



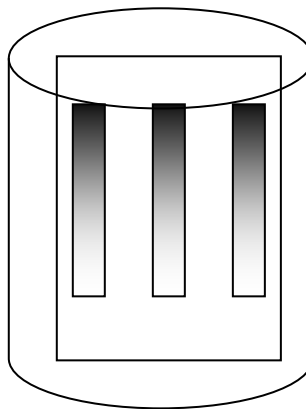
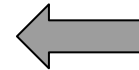
Electroforesis en gel de agarosa



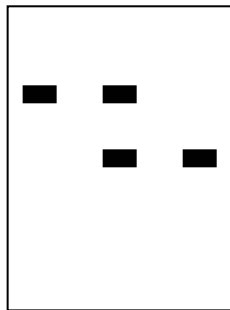
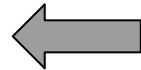
Transferencia



Marcación de la sonda



Hibridación

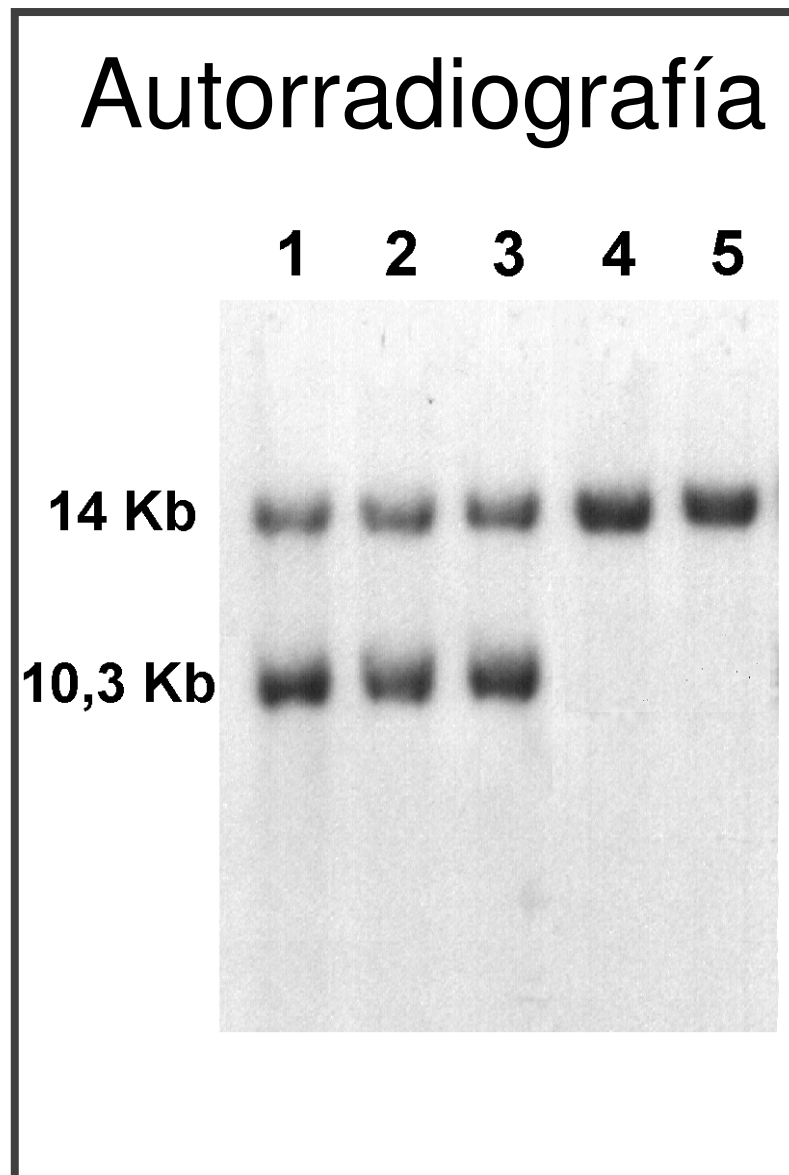
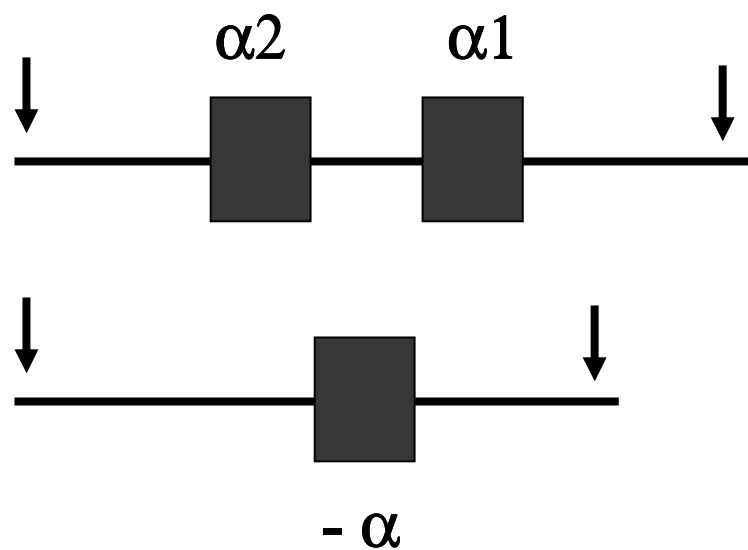


Radioautografía





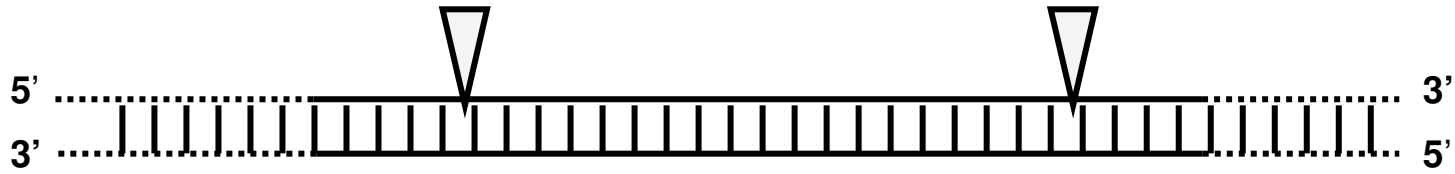
Deleciones en los genes de α -globina



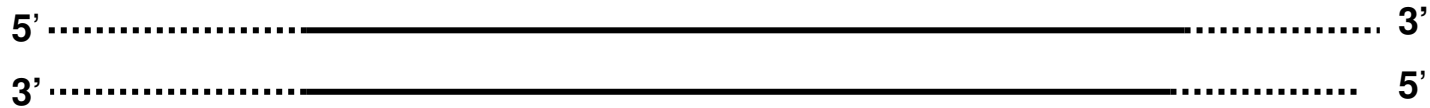
PCR



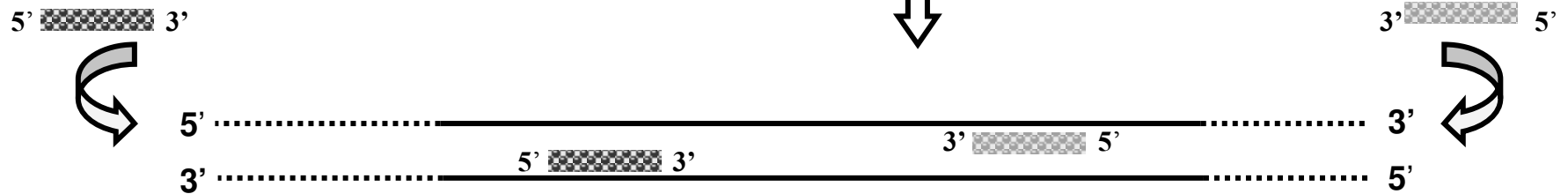
PCR



Desnaturalización

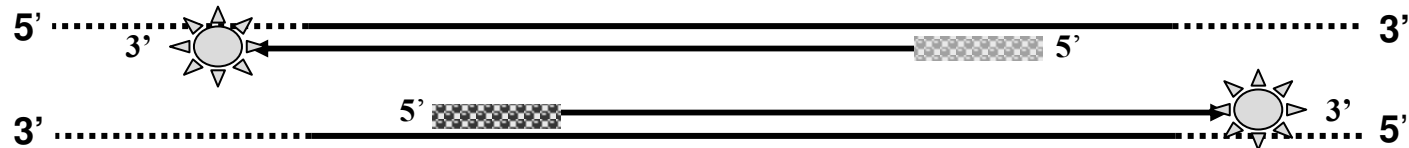
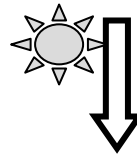


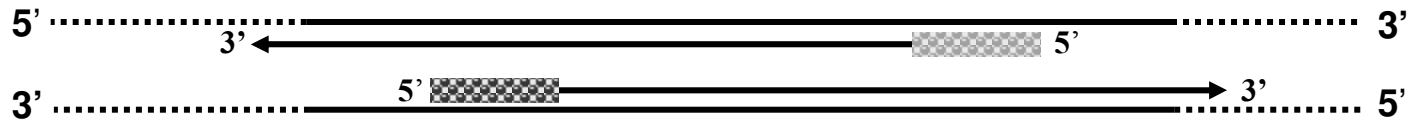
Annealing



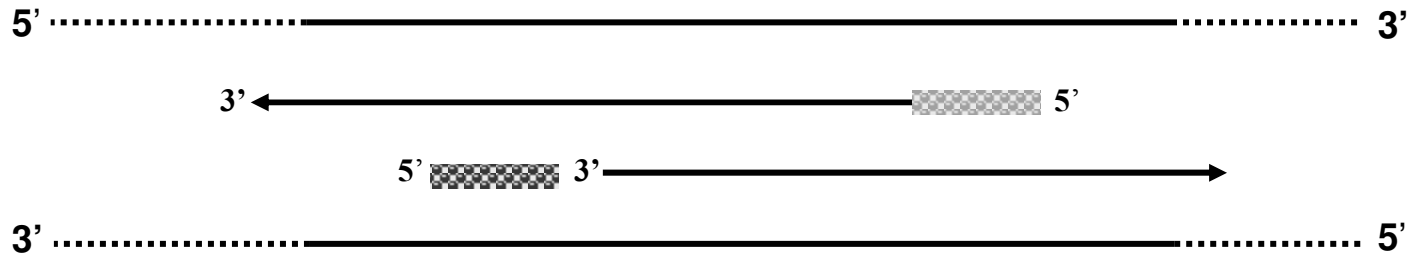
Polimerización

Taq pol
dNTPs

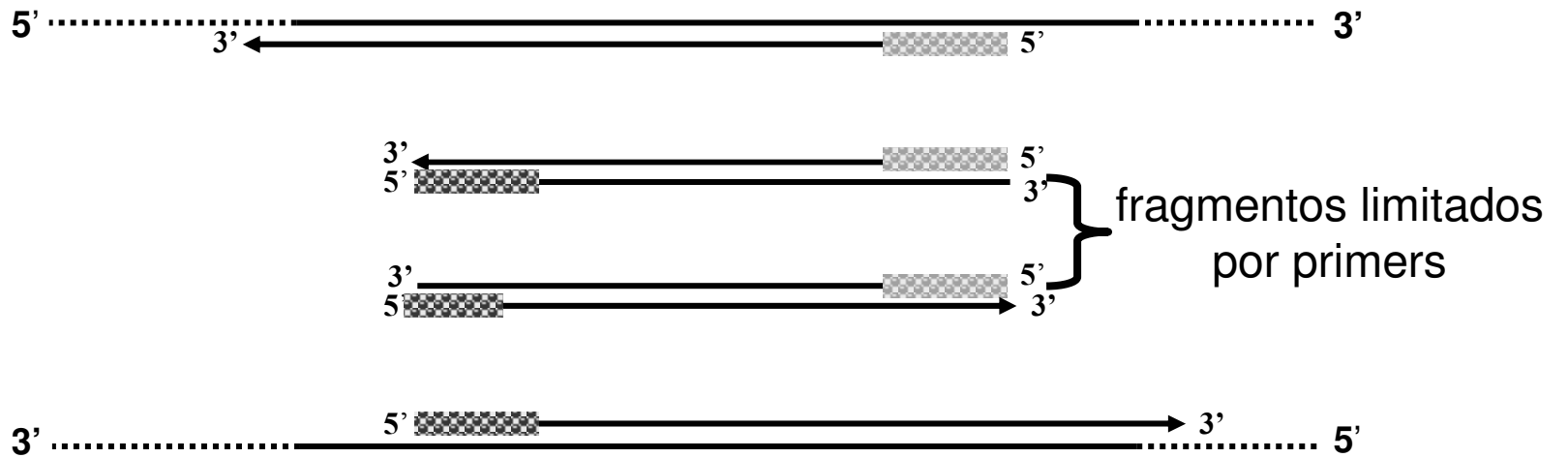


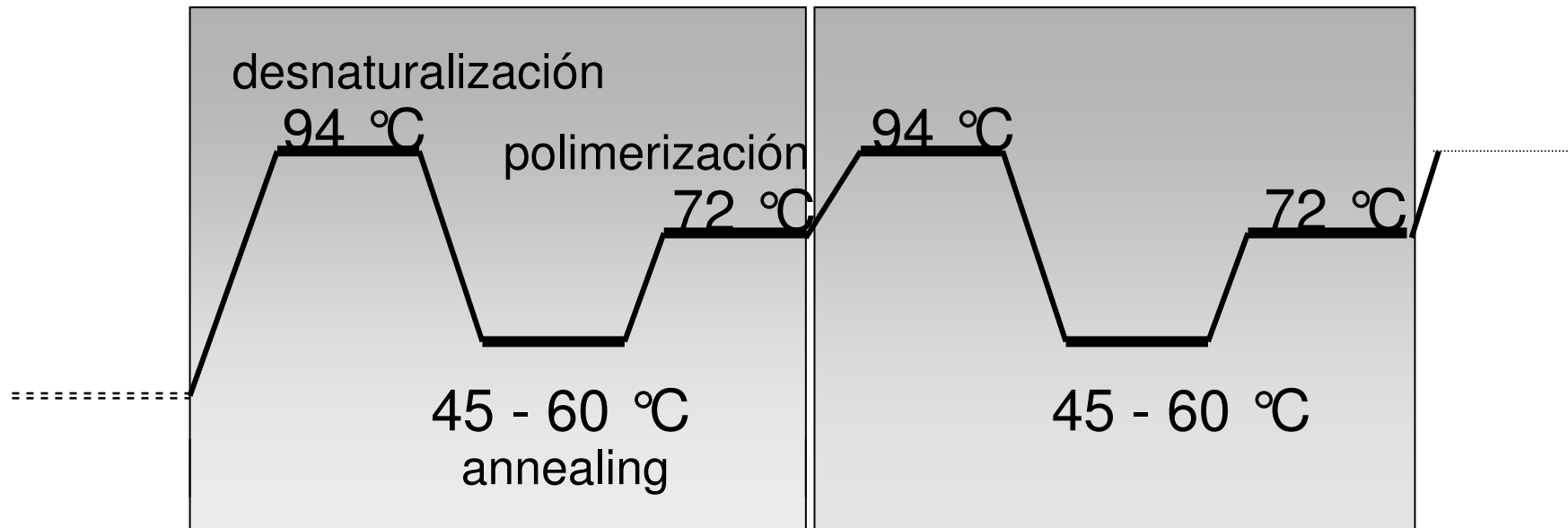


Desnaturalización



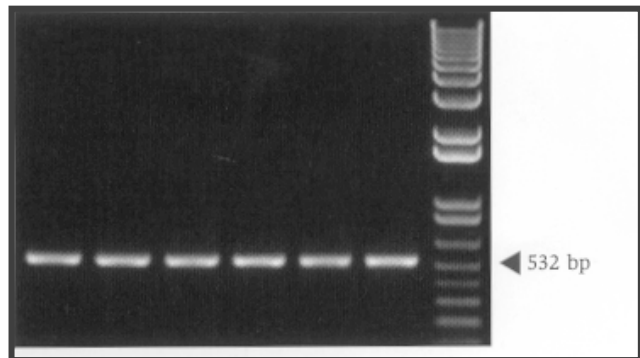
Annealing y Polimerización



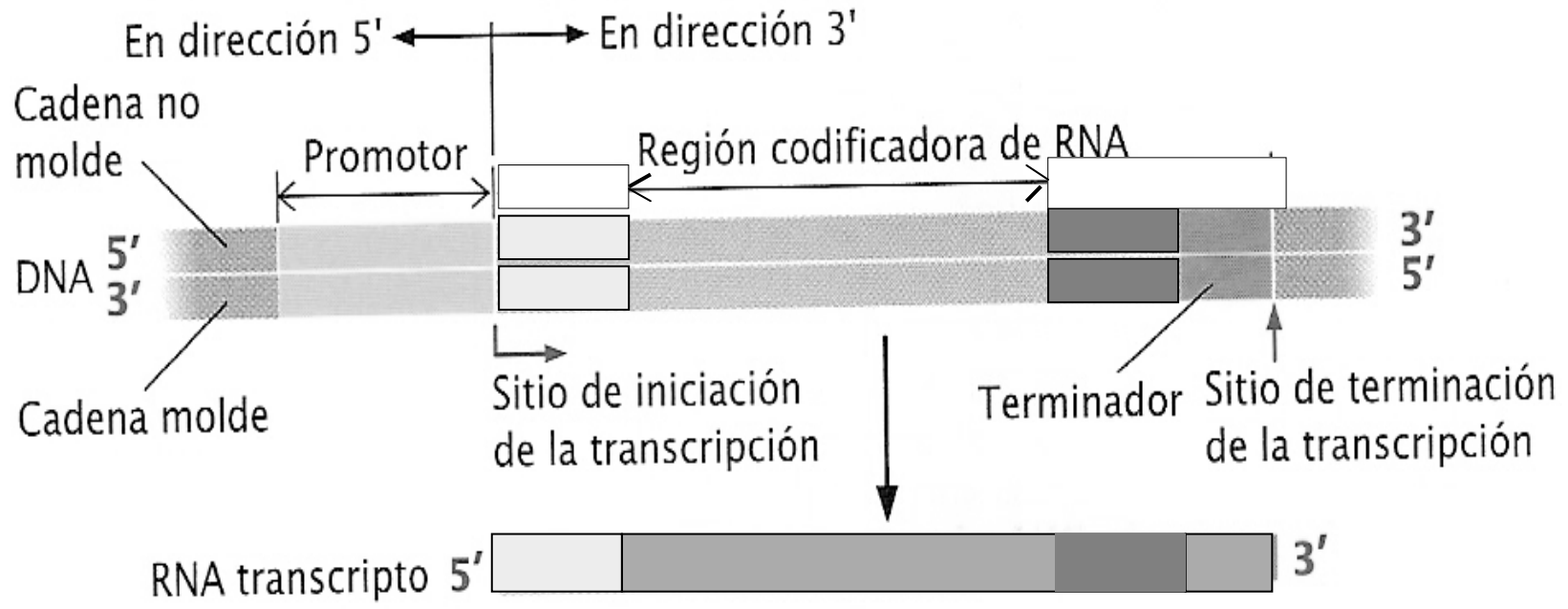


Primer ciclo

Segundo ciclo

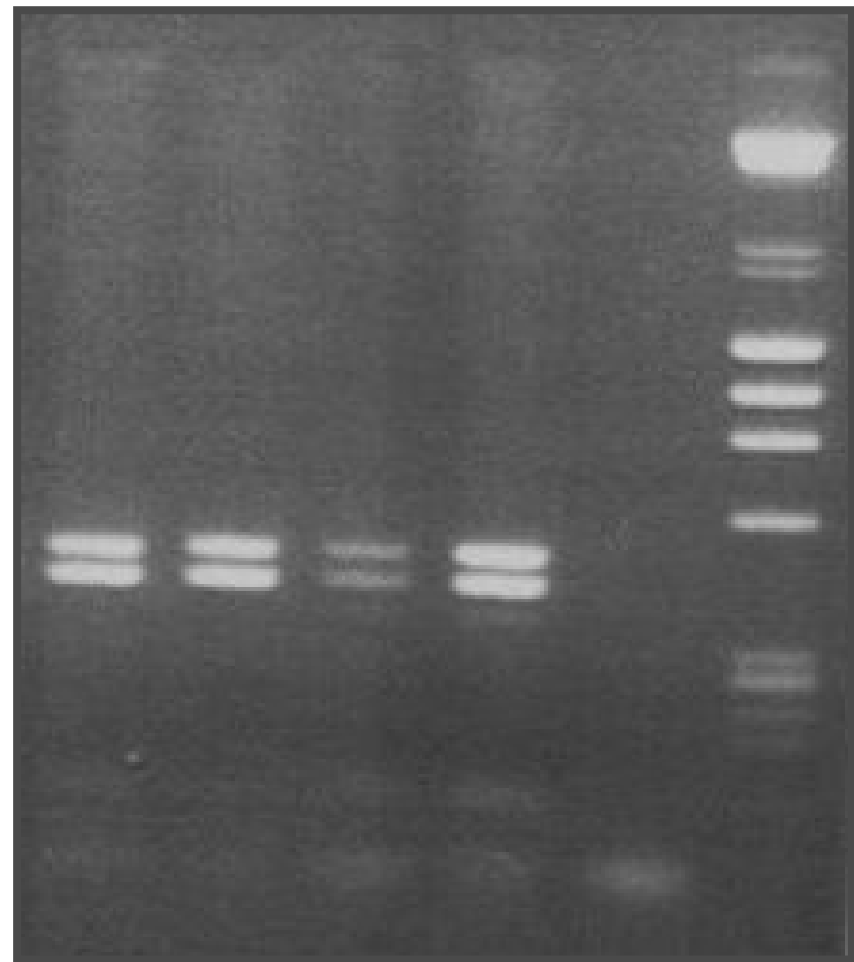
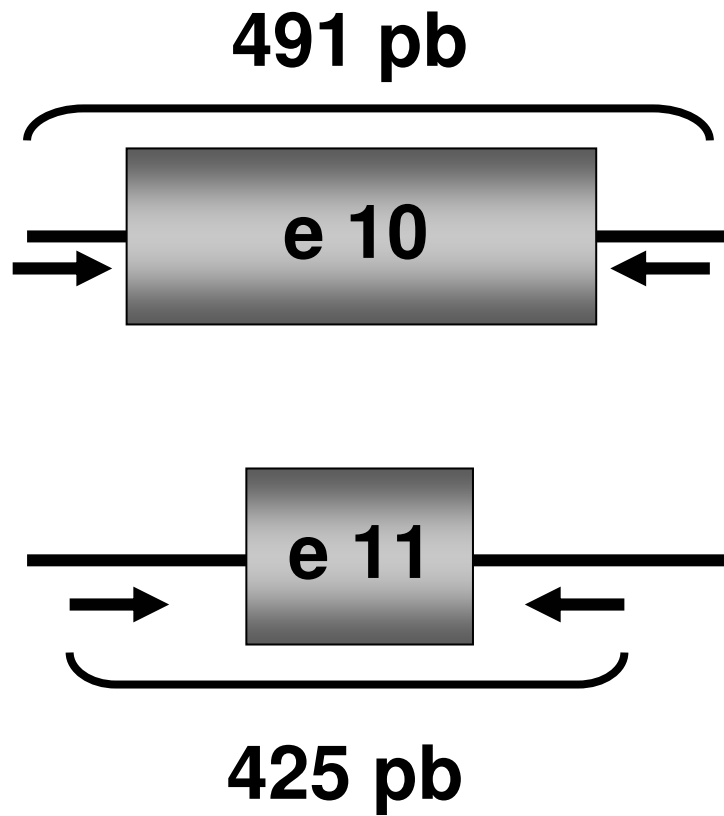


Unidad de transcripción

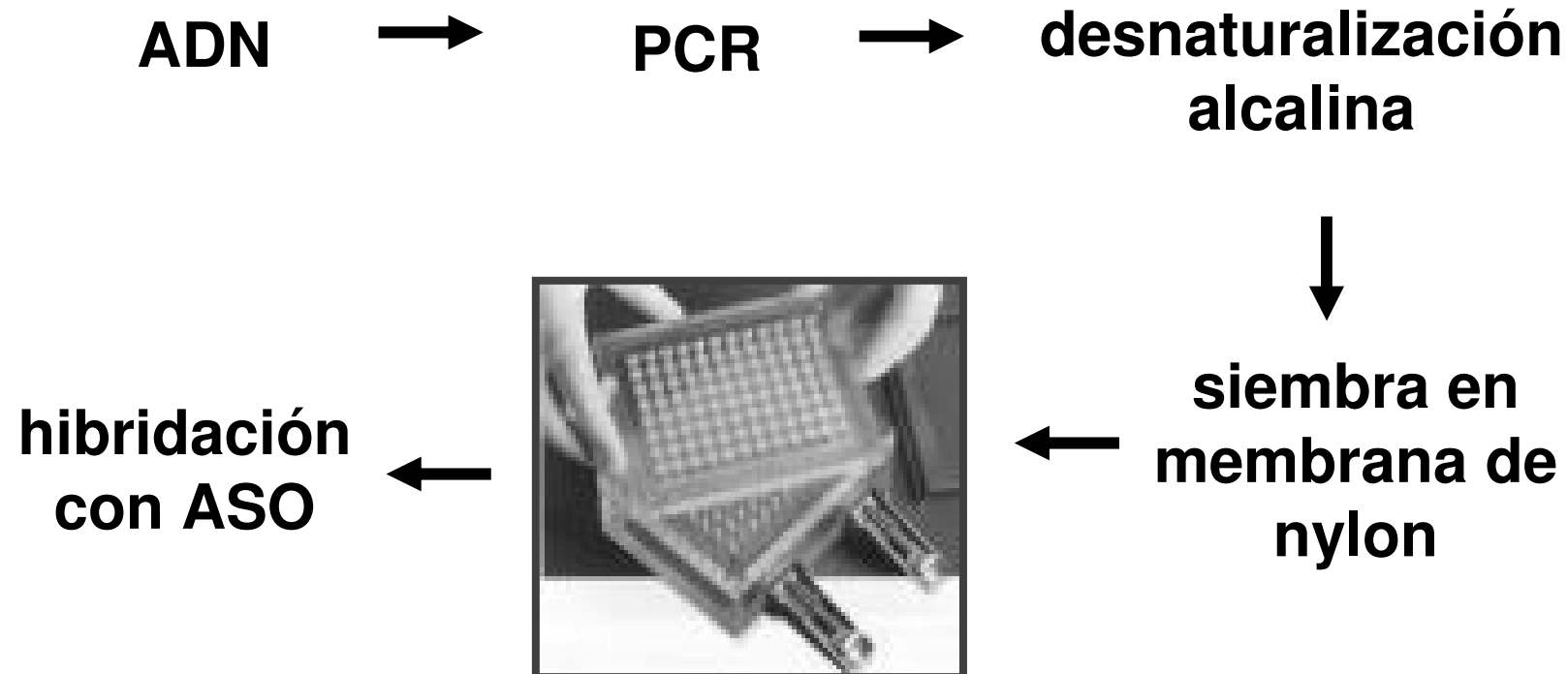




PCR Multiplex



Detección de mutaciones puntuales
Dot-Blot e hibridación con
sondas de oligonucleótidos aleloespecíficas

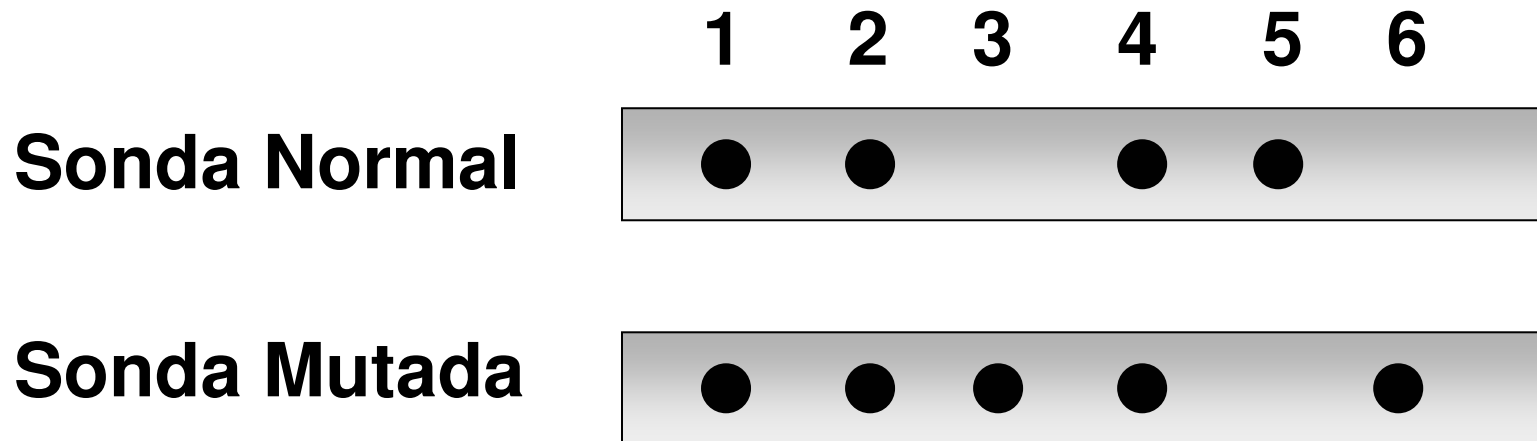


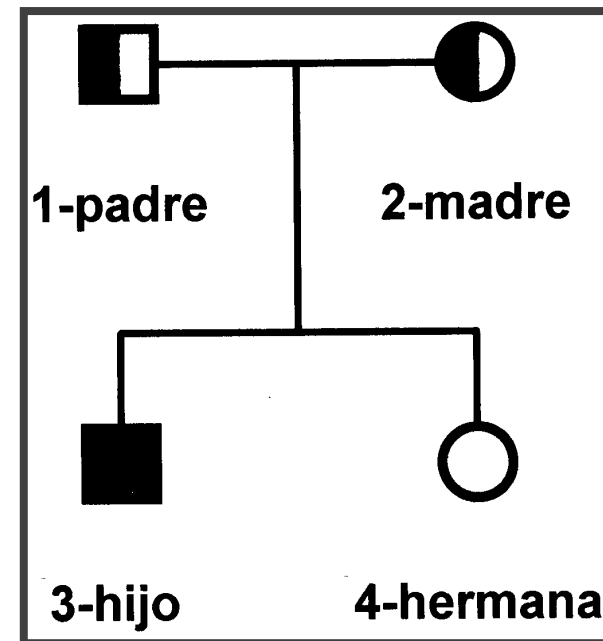
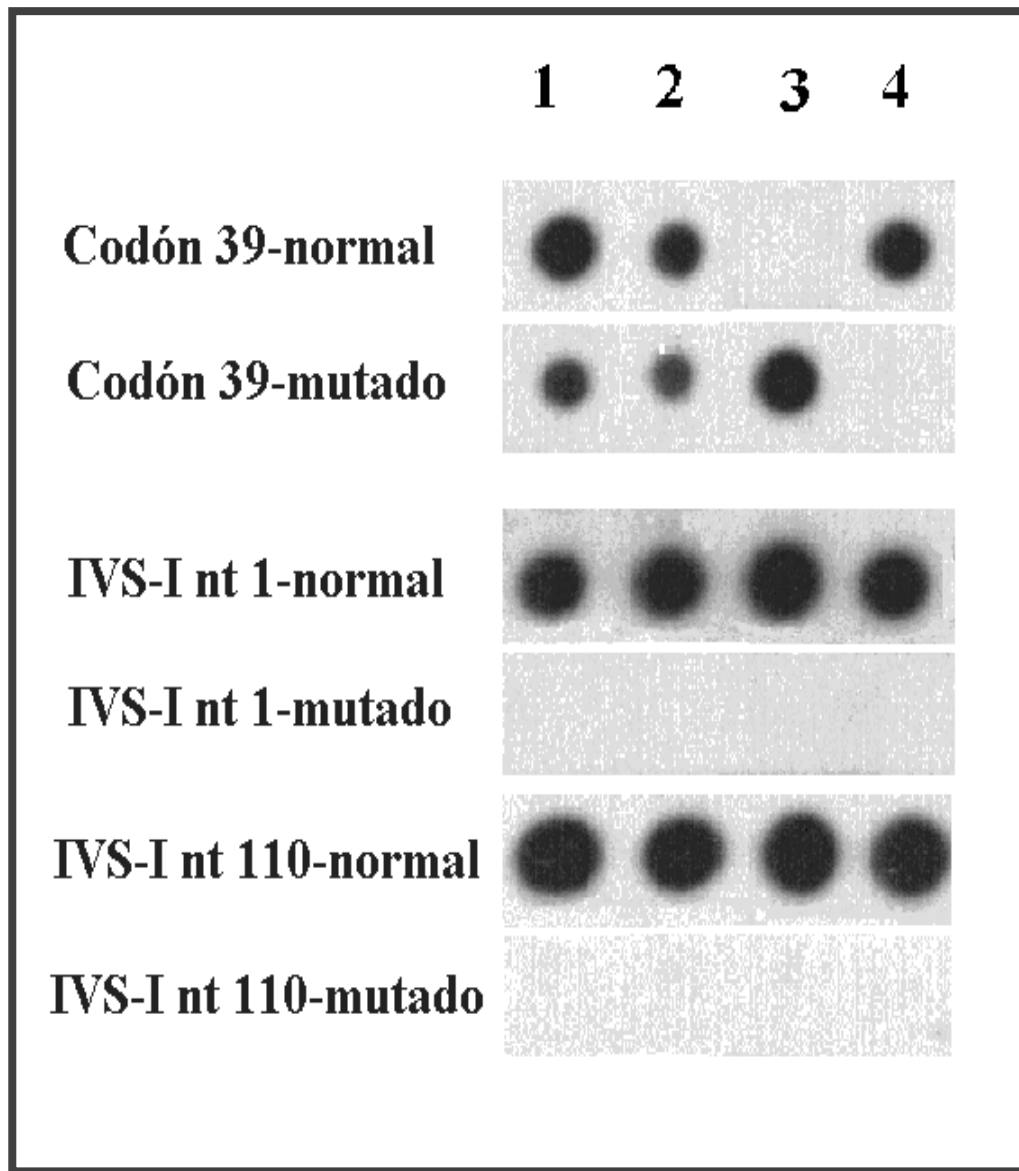
Sonda Normal **AAGTTGTACCTTCTAGGCGT**



Sonda Mutada **AAGTTGTACGTTCTAGGCGT**

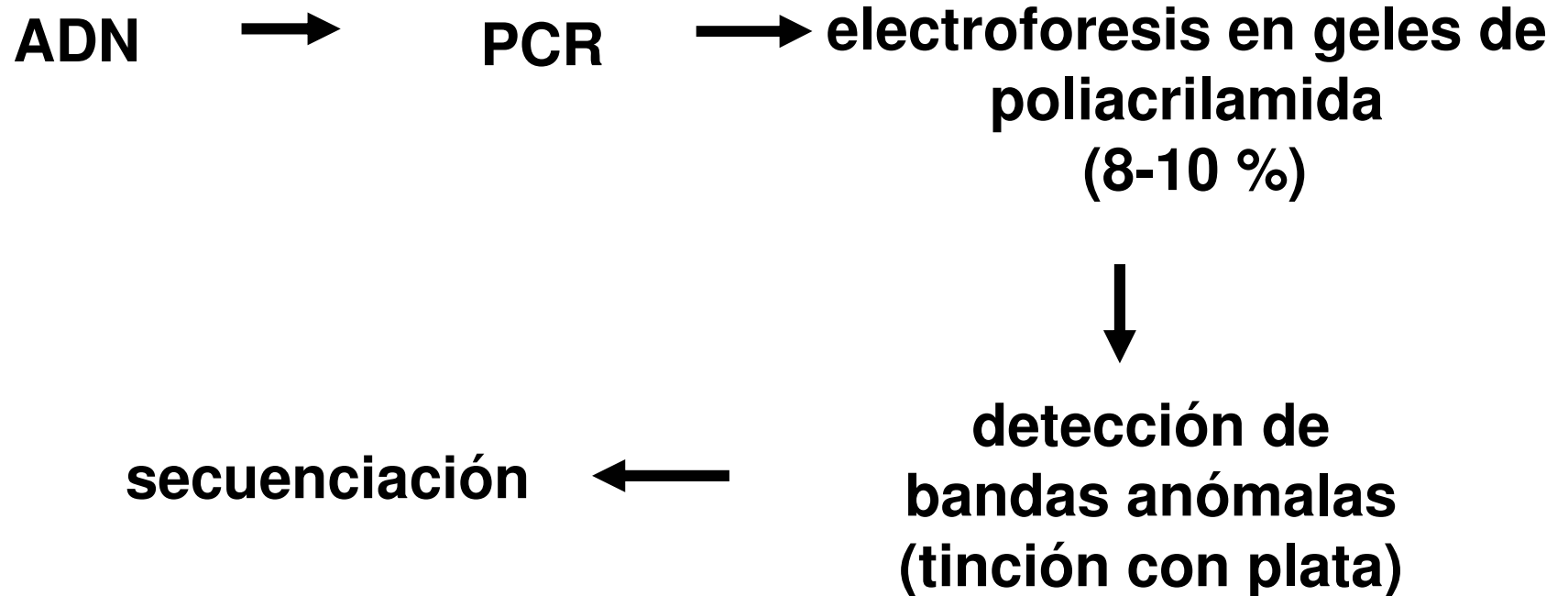
Resultado de hibridación

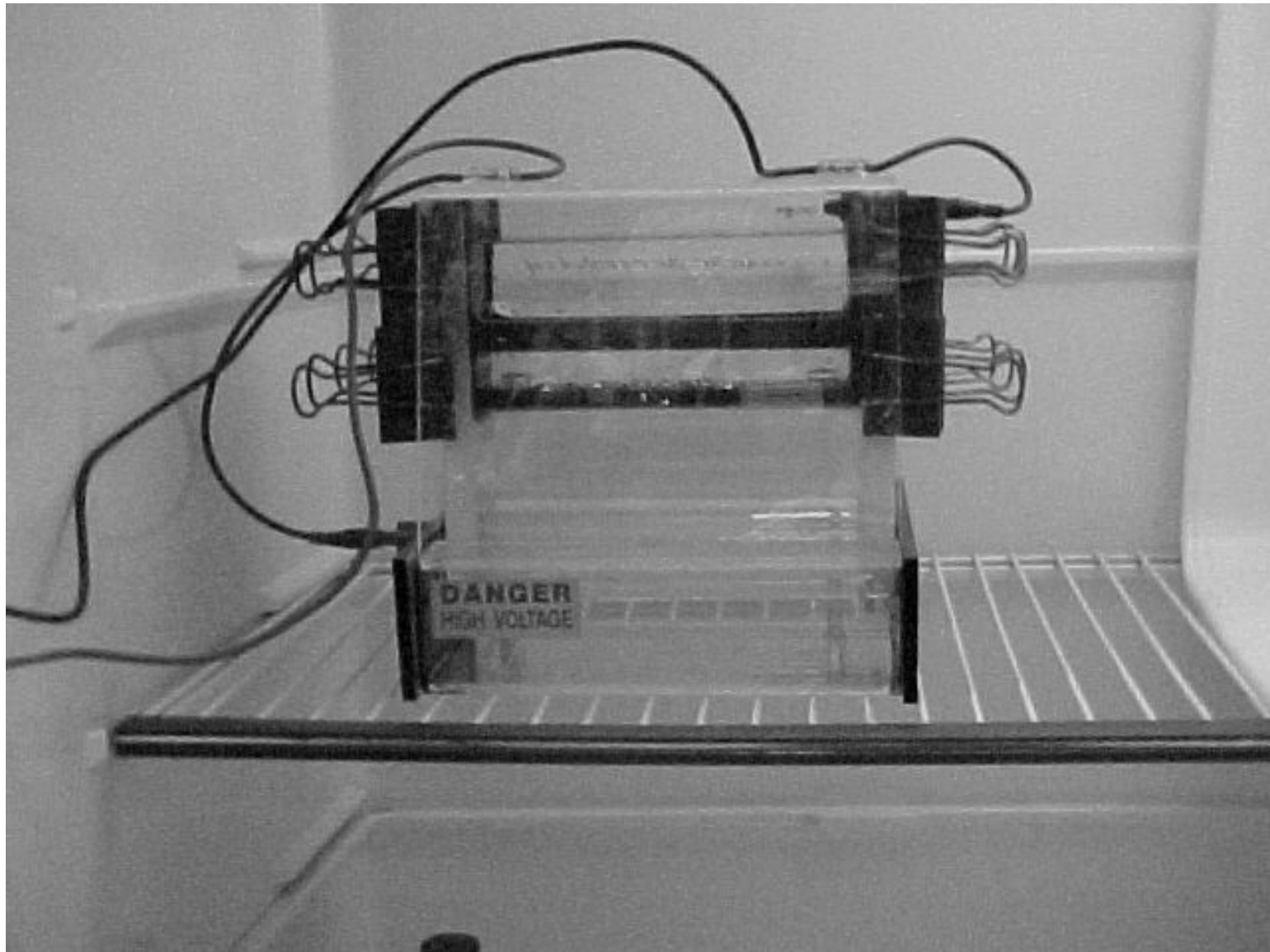




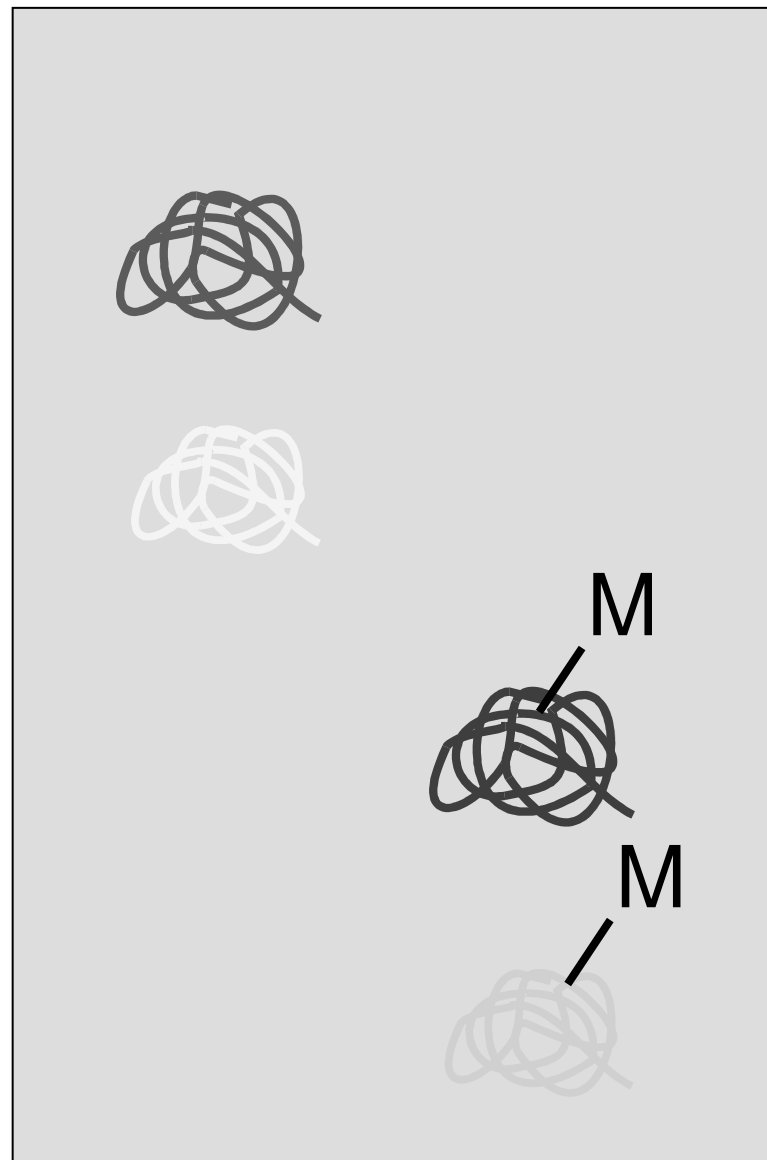
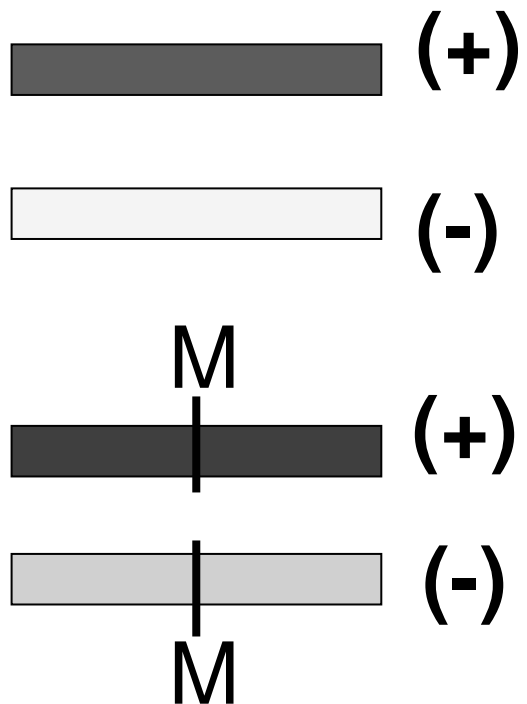
Screening de mutaciones puntuales

SSCP, Heterodúplex



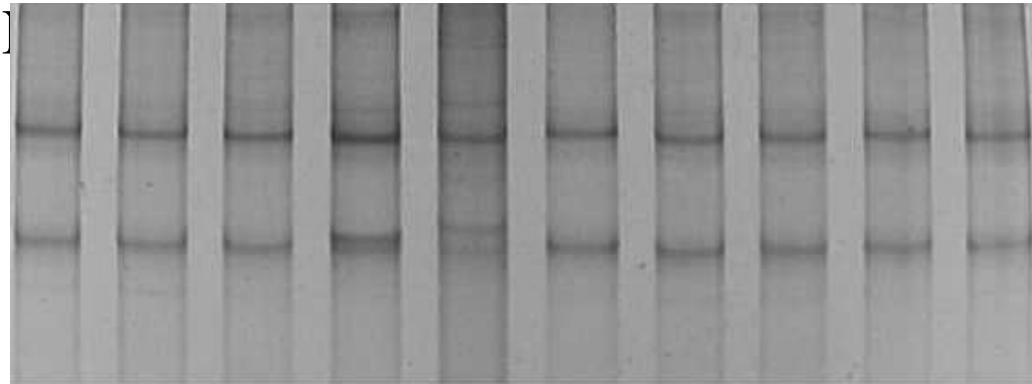


Single Strand Conformation Polymorphism



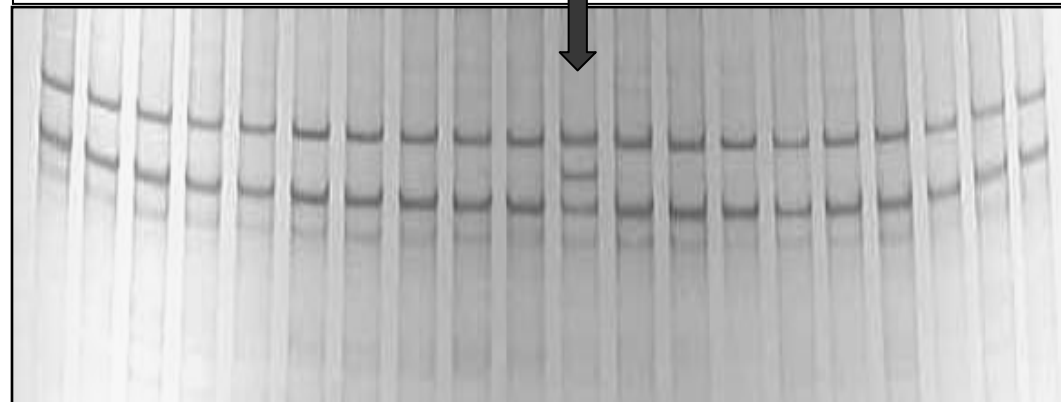
Estudio poblacional por SSCP del exón 10 del receptor beta de hormonas tiroideas

N1 N2 N3 M1 M2 N4 N5 N6 N7



N1 a N8: normales, M1 y M2: mutados

DA PL AE SF OC GF CS PD LJ LC GA CR AD SA TM N3 N22 N30 N2 N14



Gel de poliacrilamida al 10 % sin glicerol.

SECUENCIACION



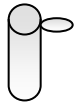
Método de Sanger

ADN cadena simple
Cebador marcado

3' CGTATACAGTCAGGTC 5'
5' GCAT 3'

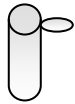
ADN polimerasa I (Fragmento Klenow)

dATP
dCTP + ddATP
dGTP
dTTP



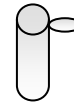
GCATA
GCATATGTCA
GCATATGTCAGTCCA

dATP
dCTP + ddTTP
dGTP
dTTP



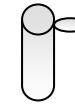
GCATAT
GCATATGT
GCATATGTCAGT

dATP
dCTP + ddCTP
dGTP
dTTP

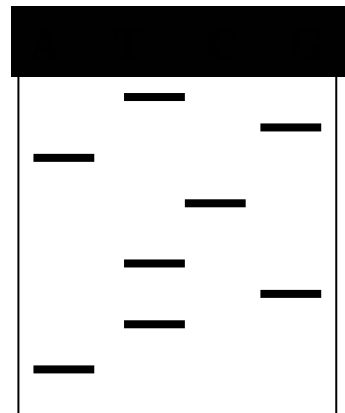
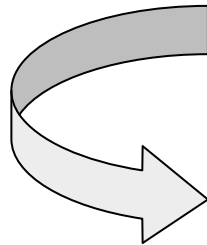


GCATATGTC
GCATATGTCAGTC
GCATATGTCAGTCC

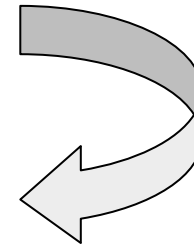
dATP
dCTP + ddGTP
dGTP
dTTP



GCATATG
GCATATGTCAG
GCATATGTCAGTCCAG



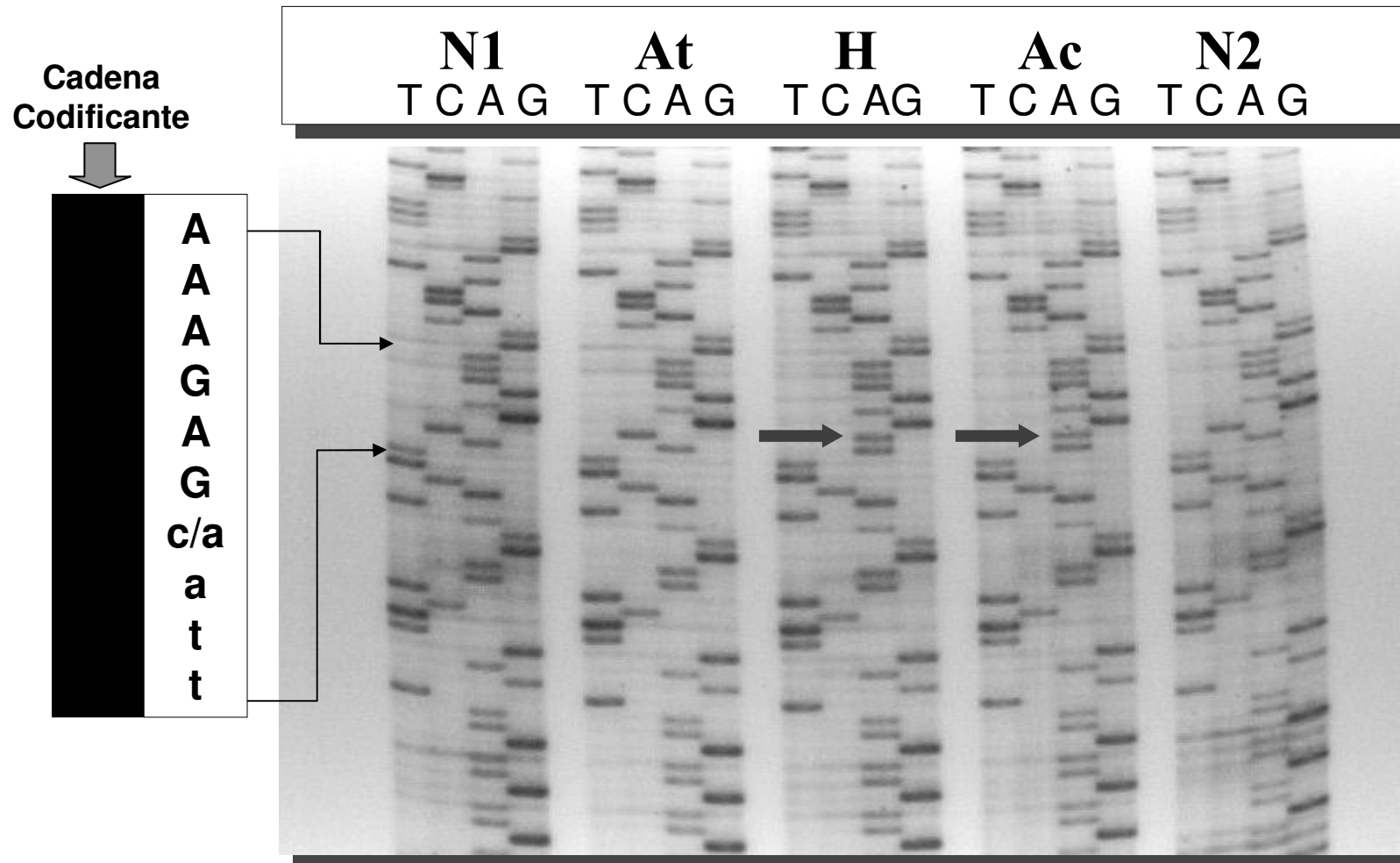
3'
T
G
A
C
T
G
T
A
5'



Cubas de Electroforesis Vertical

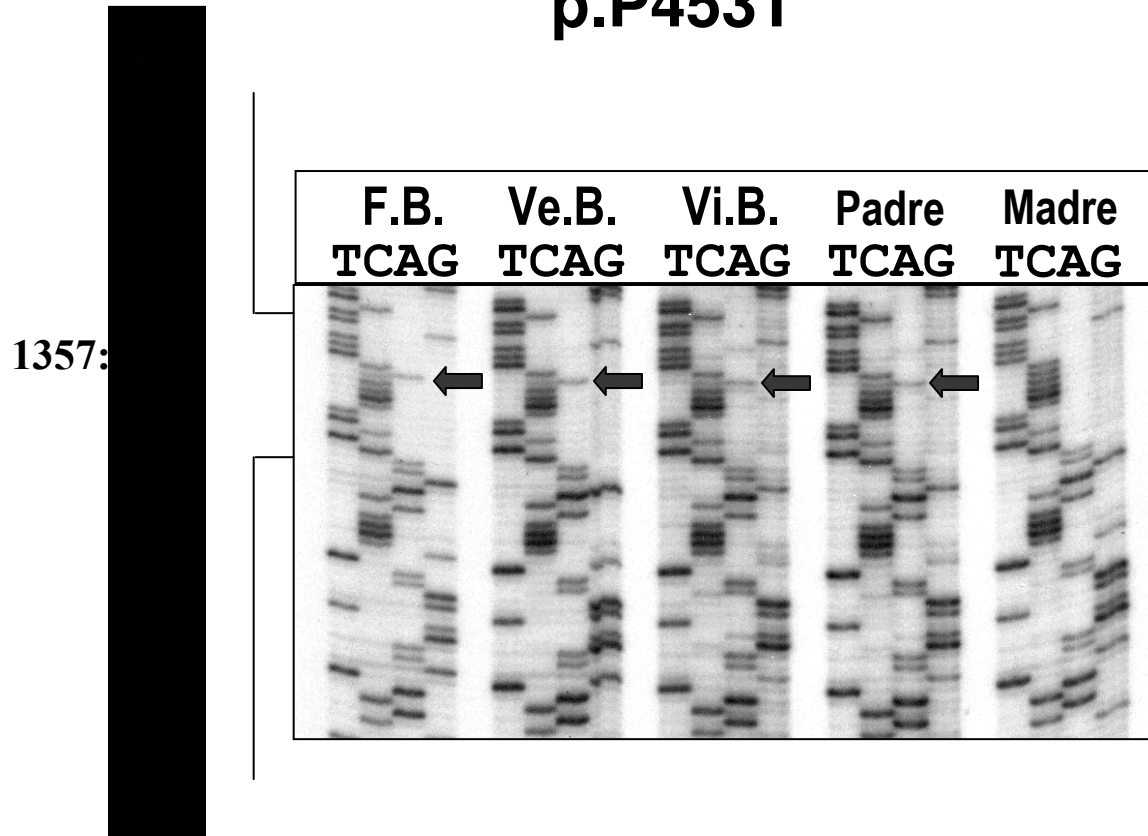


Secuenciación de la región genómica del exón 30 de Tg en la familia con bocio hereditario



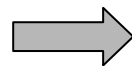
Mutación en el exón 10 p.P453T

Familia 1



Alelo Normal

CCT
Pro (453)

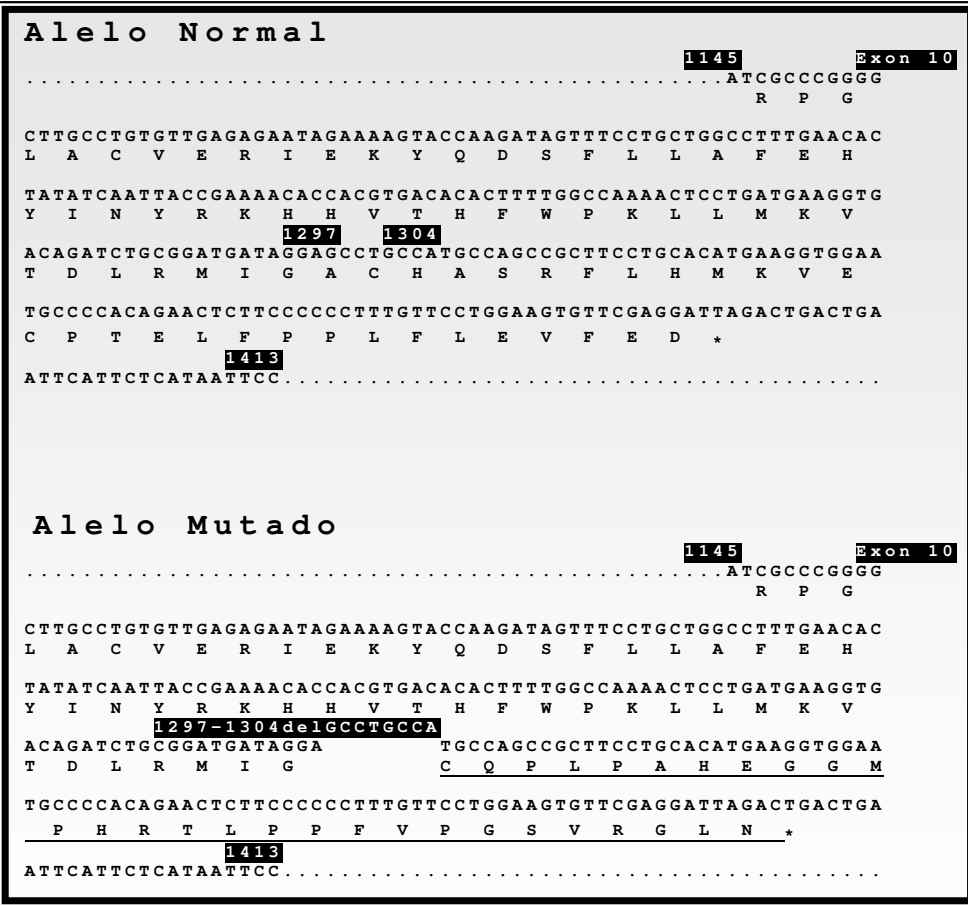
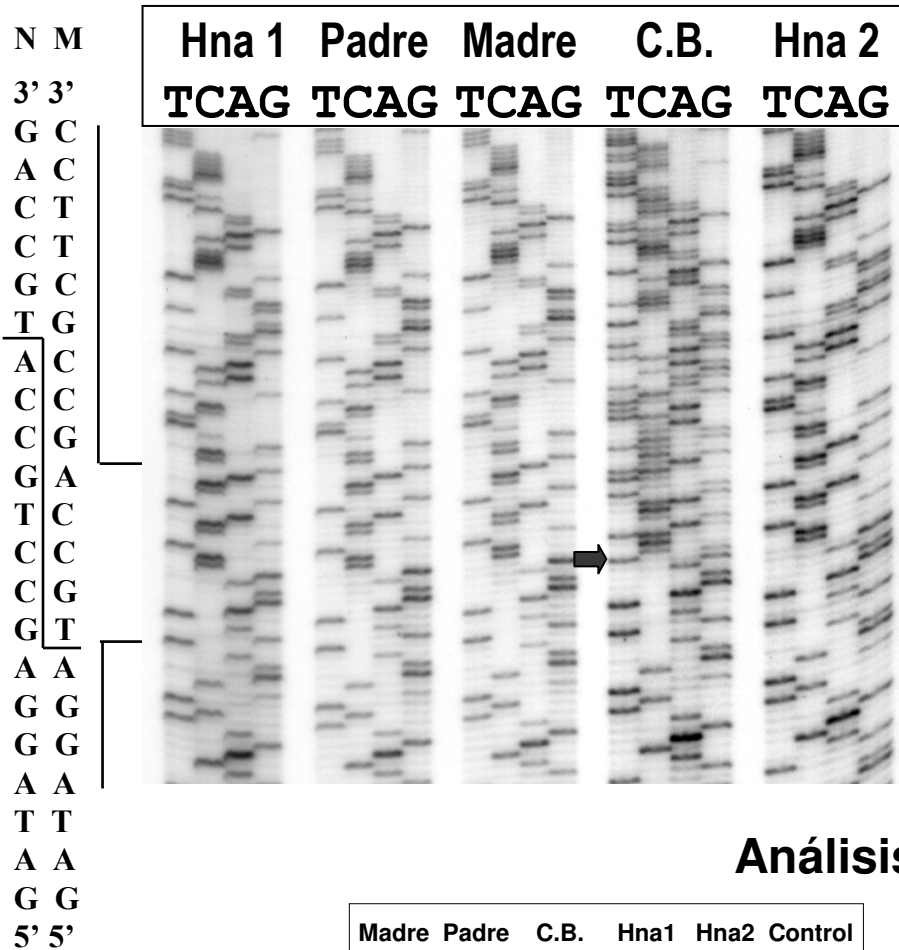


Alelo Mutado

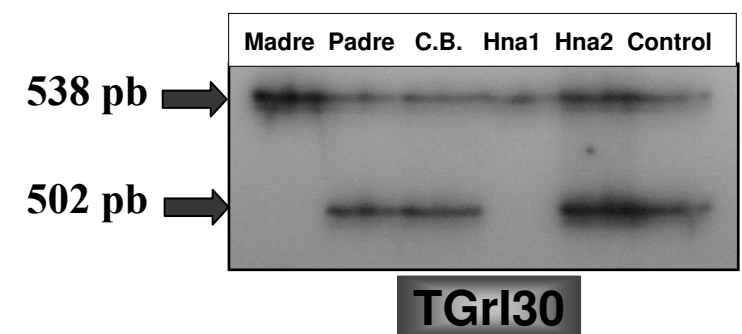
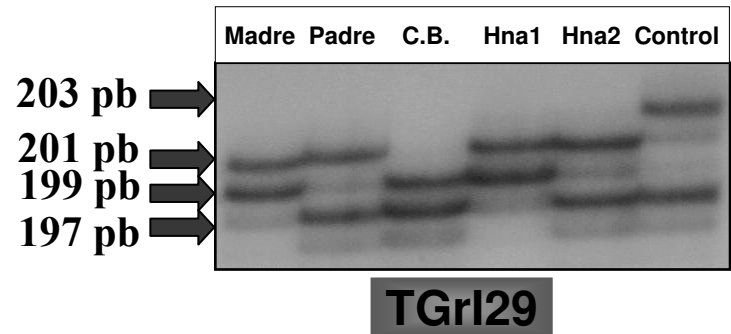
ACT
Thr (453)

Nueva deleción en el exón 10 : c.1297-1304delIGCCTGCCA

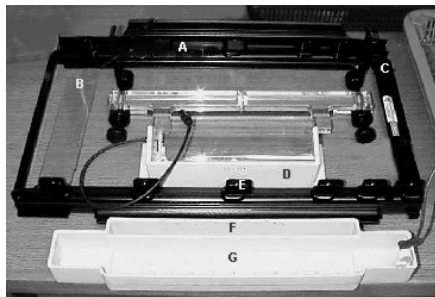
Familia 4



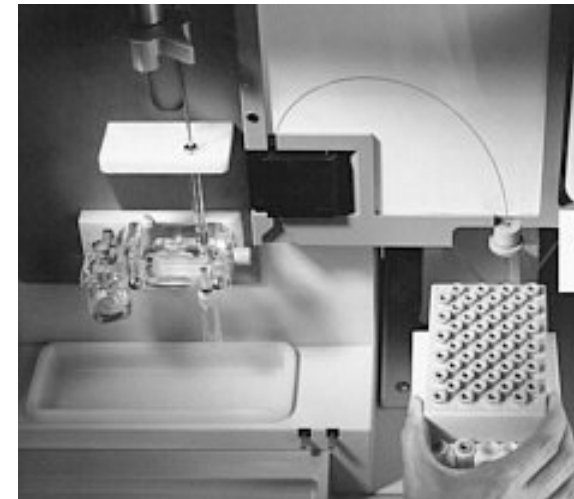
Análisis de microsatélites



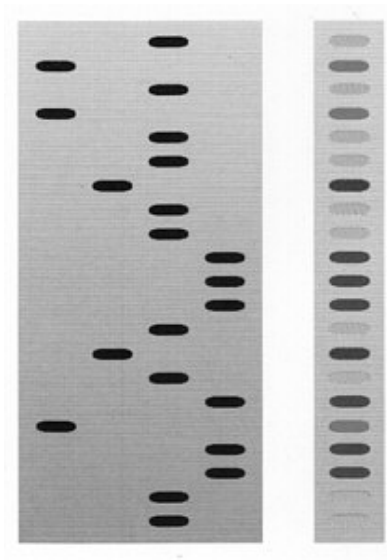
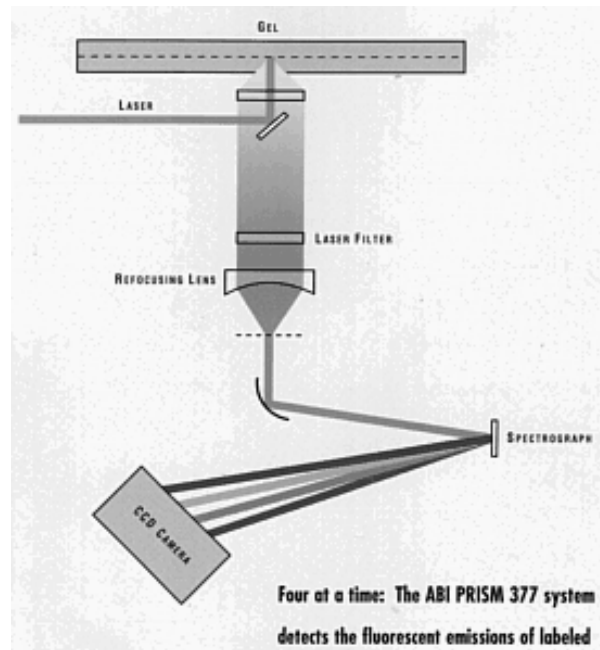
Sec. Automática en gel



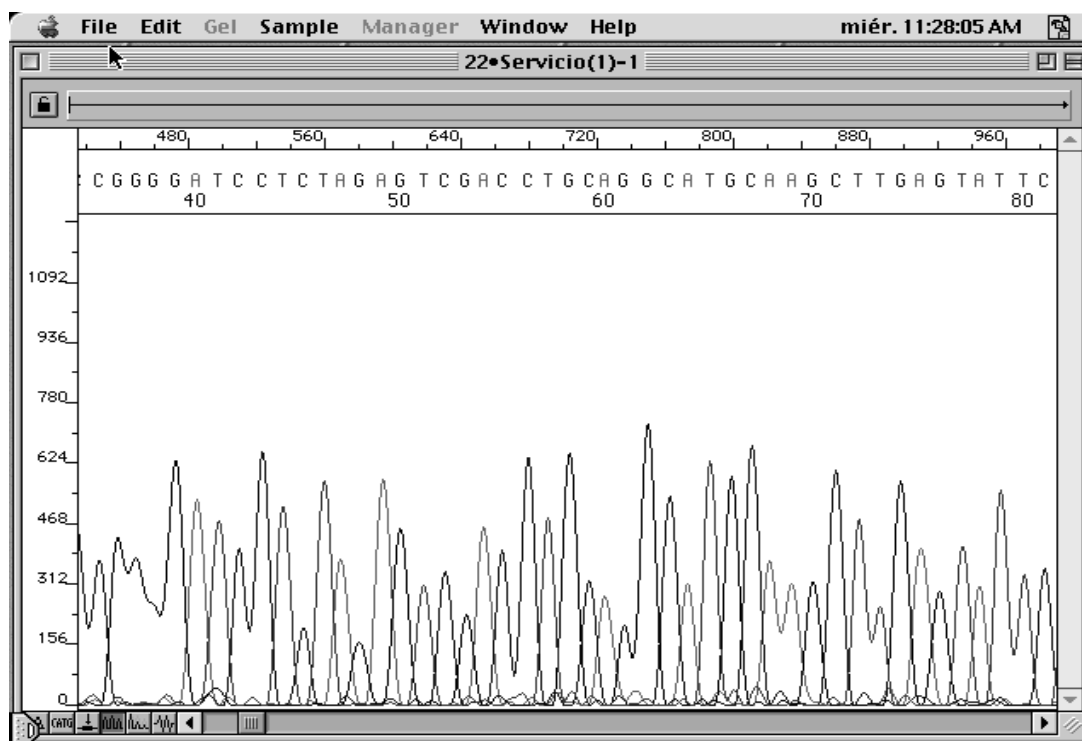
Sec. Automática capilar



Sistema de detección



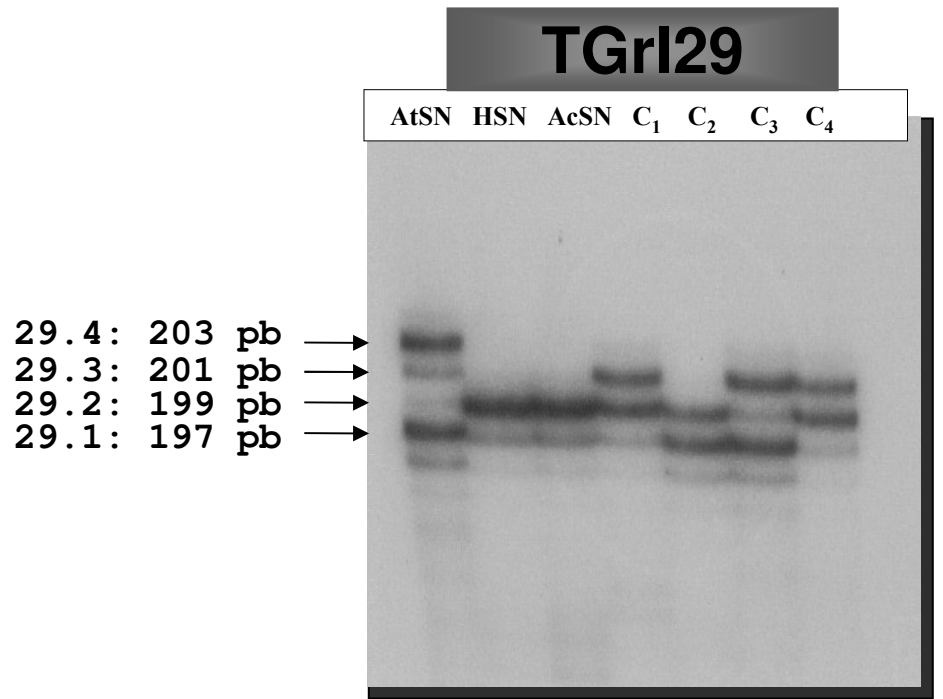
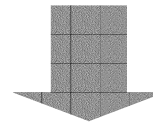
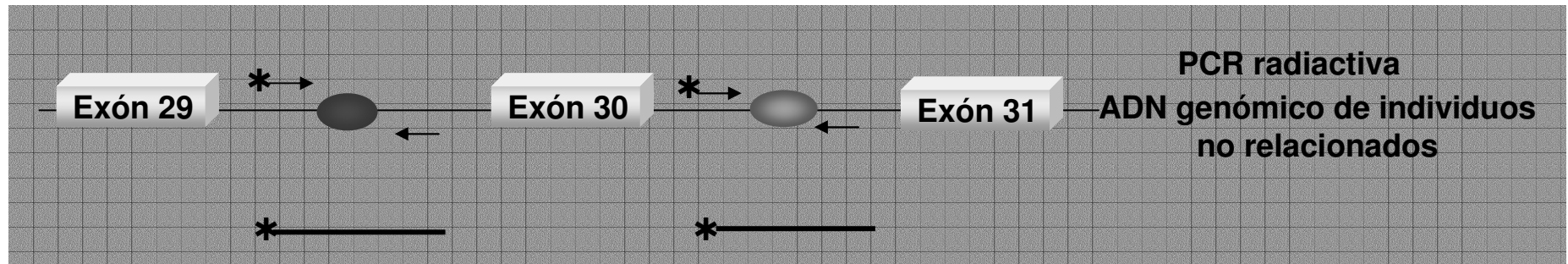
Cromatograma



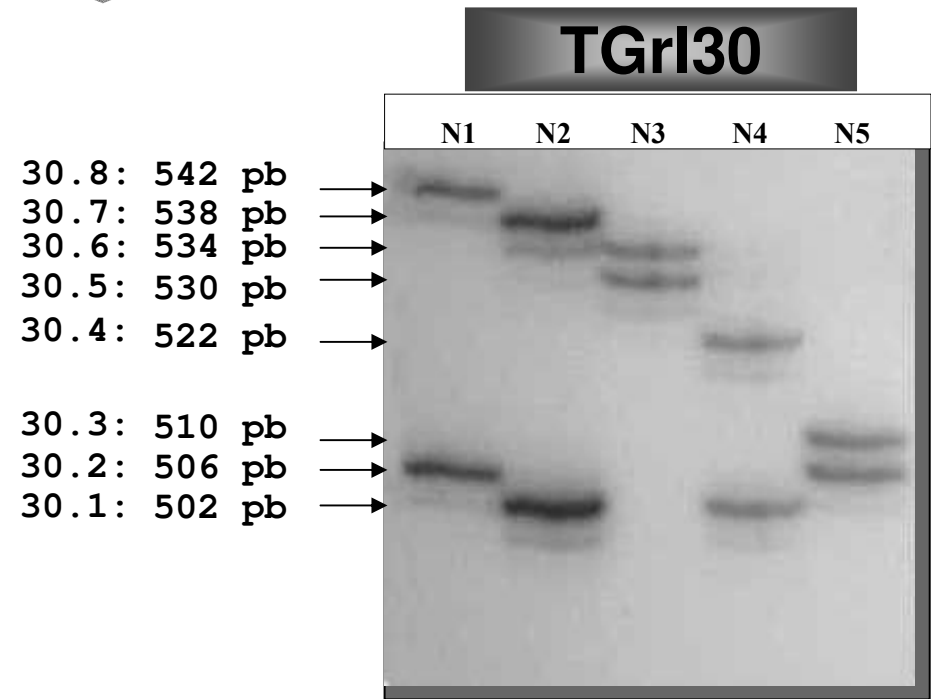
ESTUDIOS INDIRECTOS



Genotipificación de los marcadores microsatélites



140 cromosomas analizados



304 cromosomas analizados



Genética Molecular del Receptor de Hormonas Tiroideas.



Resistencia a Hormonas Tiroideas (RTH)

Incidencia: 1/50000 nacidos vivos

Diagnóstico:

- * Elevados niveles de T3 y de T4 séricas**
- * Niveles de TSH normales o levemente elevados**

Síntomas y signos:

Indicativos de hipotiroidismo e hipertiroidismo

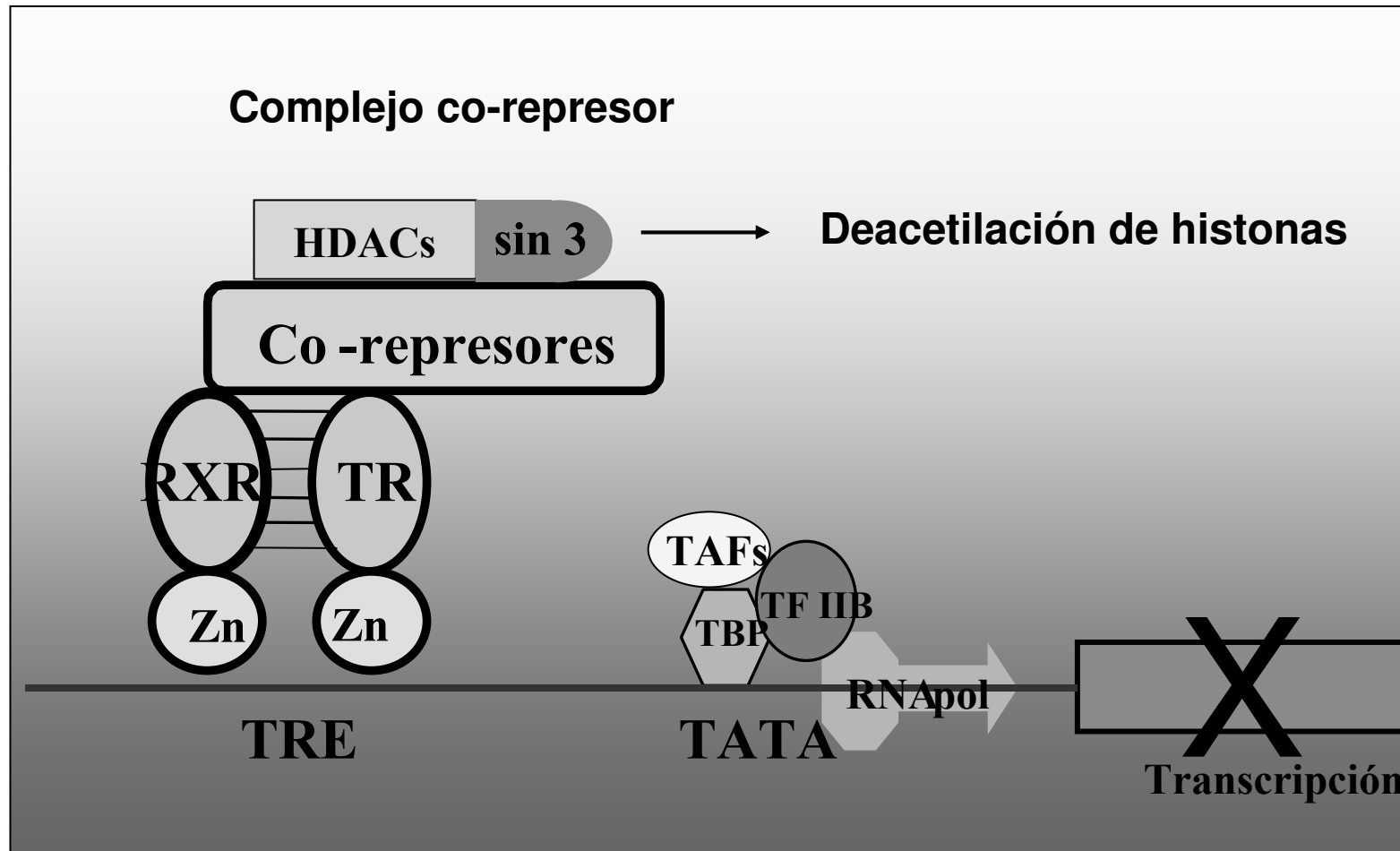
Frecuencia de Hallazgos clínicos

Síntomas Hallazgos Clínicos	Frecuencia(%)
Bocio	65-95
Bajo IQ	46
Baja Estatura	18-26
Edad ósea retrasada	29-47
Pérdida de audición	21
Taquicardia	50-80
Déficit de Atención	40-46
Hiperactividad/Dificultades en el Aprendizaje	19-42
Elevada FT4 sérica y TSH normal/alta	100

Causa molecular de RTH

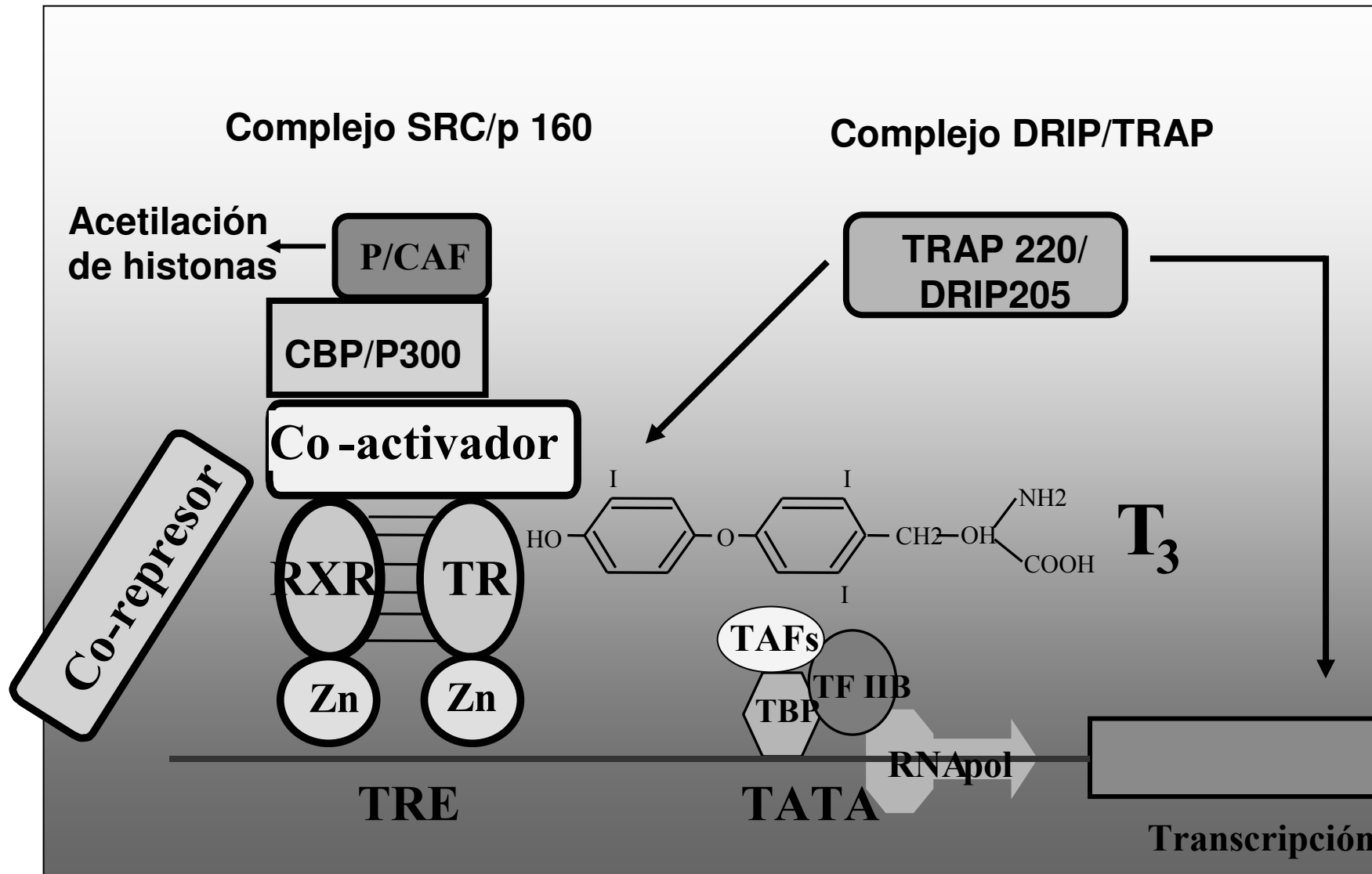
Mutaciones en el gen que codifica para el receptor beta de hormonas tiroideas.

Modelo molecular para la represión basal por co-represores en la ausencia de T3

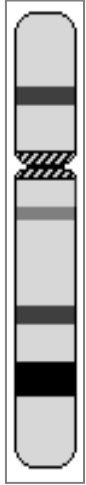
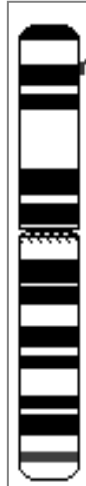


Co-represores: NCoR, SMRT

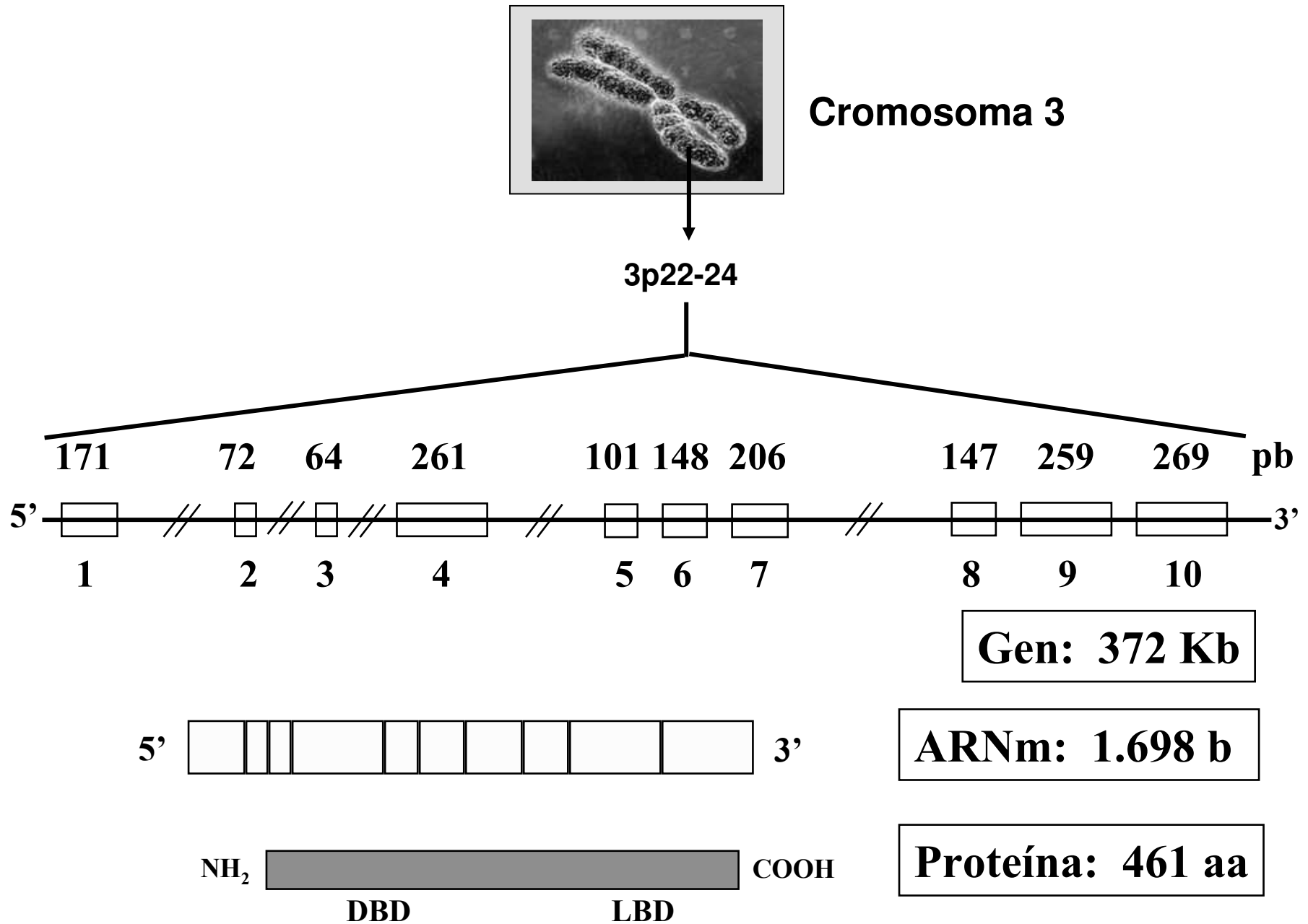
Activación transcripcional por coactivadores en la presencia de T3



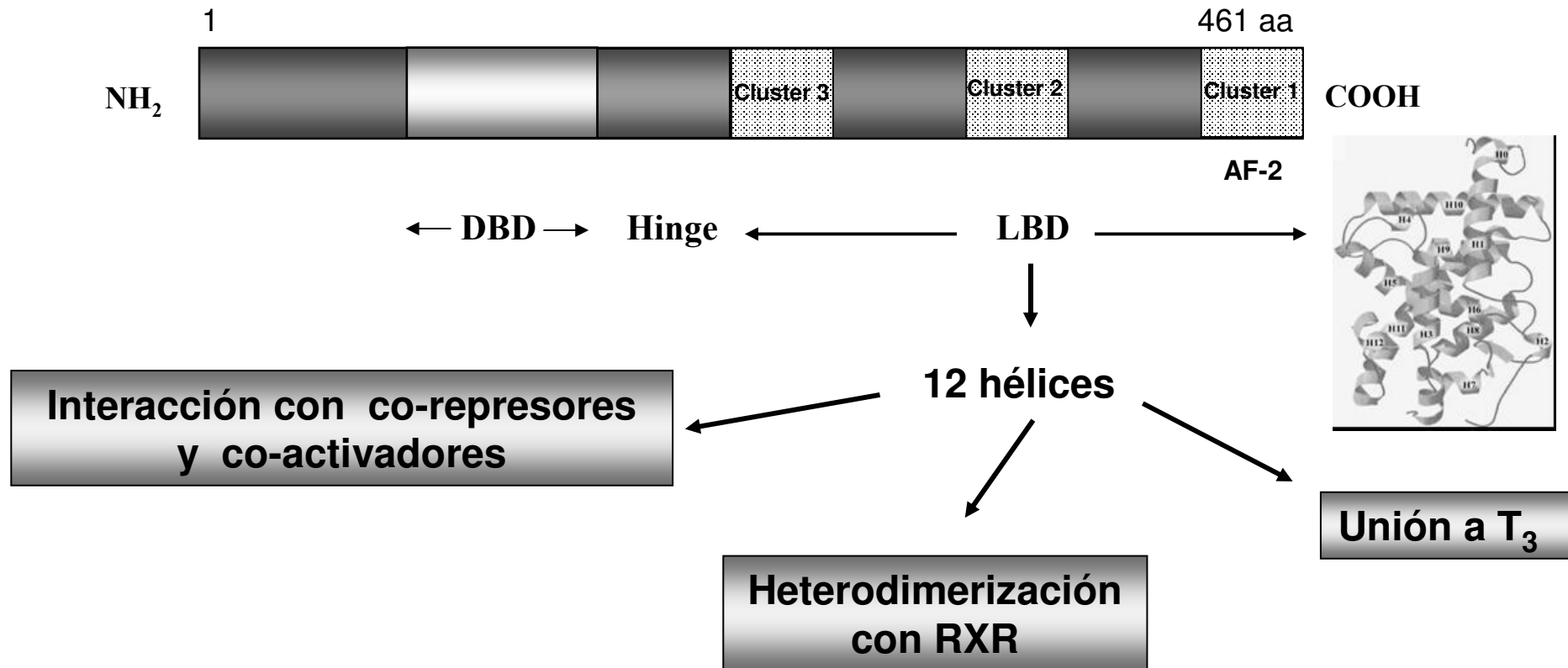
Genes que codifican a los Receptores de Hormonas Tiroideas (TRs)

Gen	Cromosoma	Isoformas	Localización del TR
TR α	 Ch.17	$\left\{ \begin{array}{l} \text{TR } \alpha 1 \\ \text{TR } \alpha 2 \end{array} \right.$	Generalizada Generalizada
TR β	 Ch.3	$\left\{ \begin{array}{l} \text{TR } \beta 1 \\ \text{TR } \beta 2 \end{array} \right.$	Generalizada Pituitaria/SNC

Representación esquemática del gen TRβ y su proteína TRβ 1



Localización de mutaciones en el gen TR β



Mutaciones identificadas en el gen TR β

D216A	P247L	V284I	C298A	V319K	R338L	R383H	K424A	K443N	F455L	c.1297-1304del GCCTG CCA
E217R	L266K	V284R	C298R	R320C	R338W	P384R	T426R	V444R	L456R	
W219K	A268D	D285A	E299A	R320H	Q340H	V389A	T426I	C446R	E457A	
E220R	F269A	K288A	I302A	R320L	K342I	V389K	D427A	C446X	E457D	c.1305-1306ins T
K223A	G251E	K288I	I302M	Y321C	G344A	E390R	L428R	T448R	E457K	
T224R	K274E	K289A	I302R	D322H	G344E	E393R	R429A	E449R	E457R	c.1358-1359ins C
E227R	I276L		I302V	D322N	G345D	Q396R	R429Q	E449X	E457T	
A228G	T277R		L305I	E324R	G345R	L400R	R429W	L450H	V458A	
A228M	V264D		K306A	L328F	G345S	L401R	M430R	F451A	V458E	
H229G	A279V		K306E	T329N	G345V	Y406K	I431T	F451I	V458G	
H229M	I280S		C309A	L330F	L346V	Y409K	A433R	F451X	V458M	
V230R	I280K		C309K	L330S	G347E	R410A	C434X	P453A	F459C	
A231R	I280M		C309W	G332E	V348E	H413R	C434R	P453E	E460K	
T232G	T281V		M310I	E333D	V348R	V414K	H435L	P453H		
T232M	T281R		M310L	E333Q	V349M	H416R	H435Q	P453S		
A234T	T281Q		M310T	M334K	D351A	W418K	S437R	P453T		
A234X	T281L		M313T	M334R	D355A	P419R	R438C	P453X		
Q235R	T281I		S314C	M334T	M358A	K420A	R438H	L454A		
R243Q	R282S		S314F	V336M	S361R	L421R	L440R	L454R		
R243W	V283I		S314Y	T337A	N364R	L422R	M442T	L454S		
	V283M		R316H	T337H	D366R	M423R	M442V	L454T		
	V284A		A317T	T337I	D367R	K424R	K443E	L454V		
Exón 7	Exón 8	Exón 9		Exón 10						

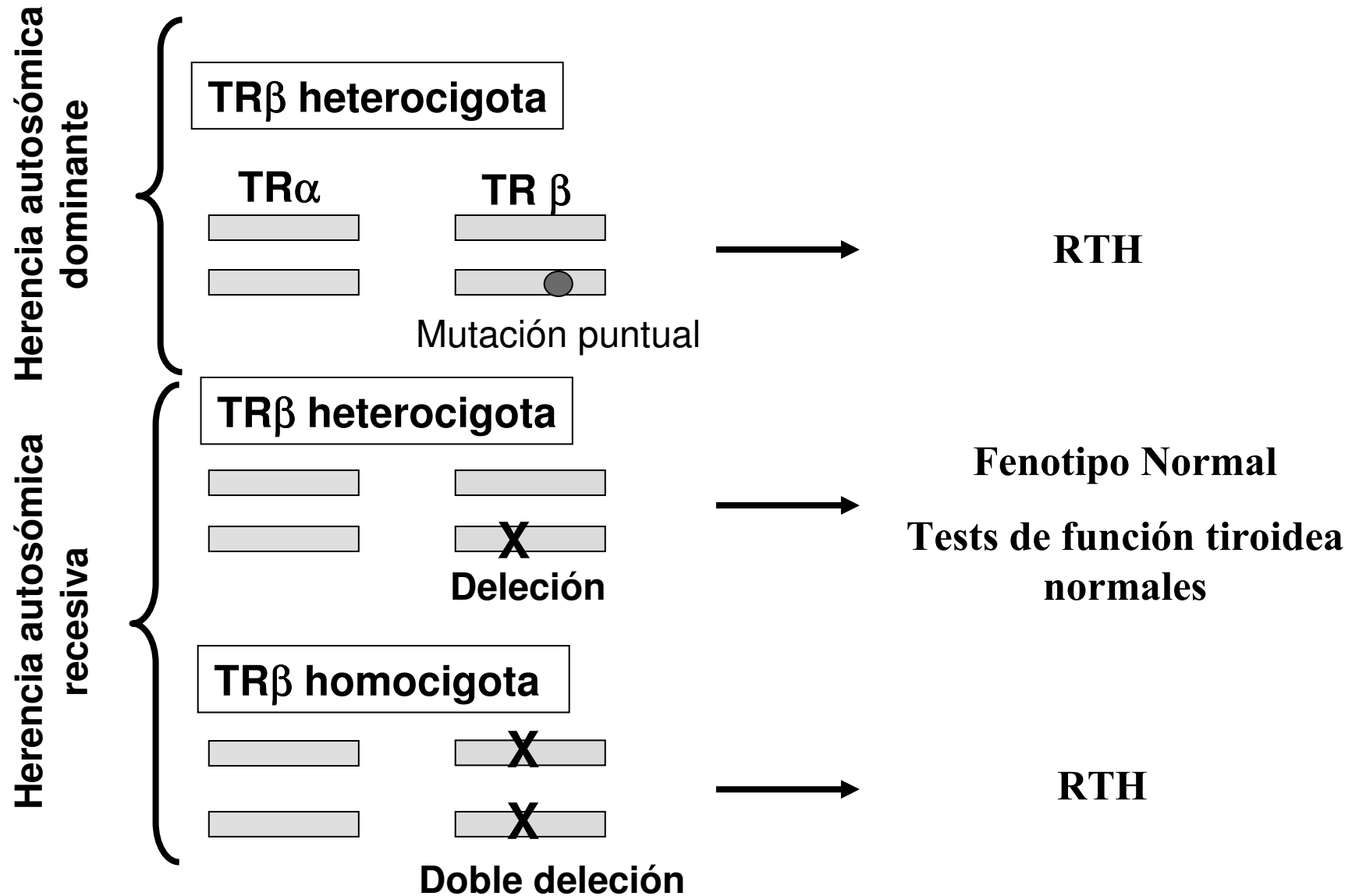
25%

75%

Características

- Tipo de mutación: Germinal
- Presencia alélica: Heterocigota
- Tipo de Herencia: Autosómica dominante

Evidencias genéticas y clínicas para la actividad dominante negativa ejercida por los TR β mutados



Dicha actividad disminuye introduciendo mutaciones en el dominio DBD

Objetivos

Identificar nuevas mutaciones en el gen TR β en pacientes con cuadro clínico compatible con RTH.

Metodología

Purificación de ADN genómico a partir de sangre periférica.

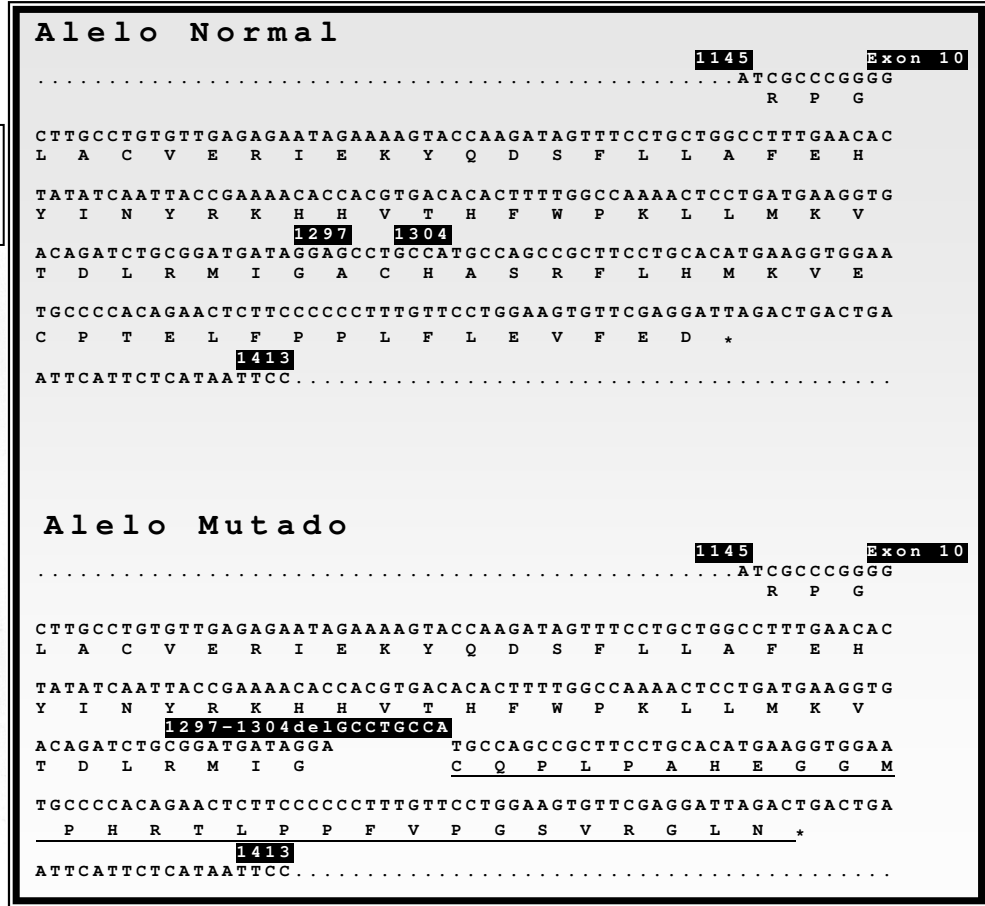
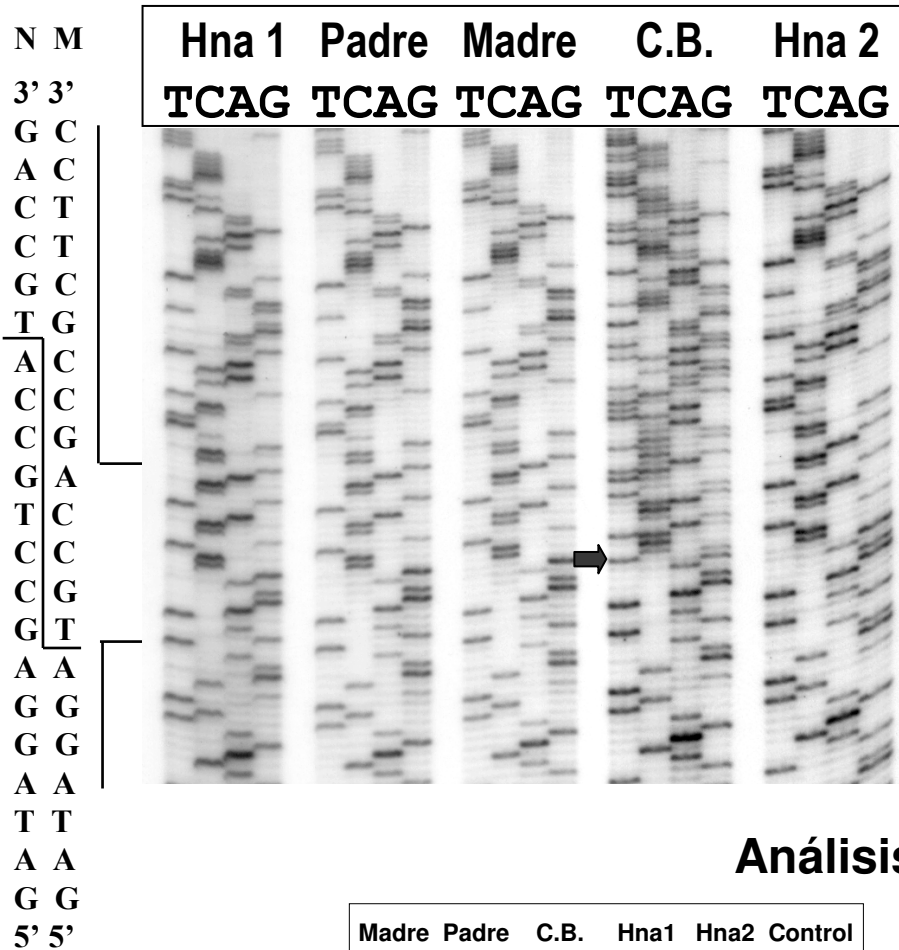
PCR de los exones 7, 8, 9 y 10

Secuenciación

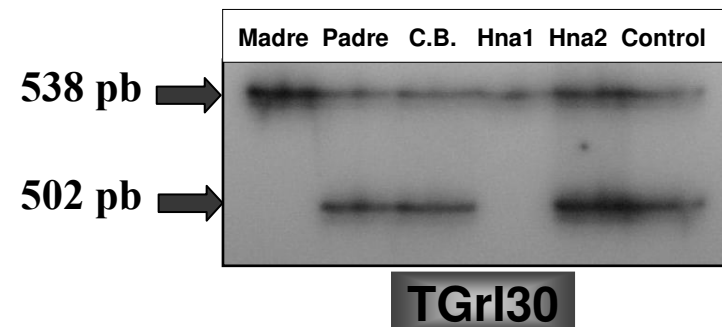
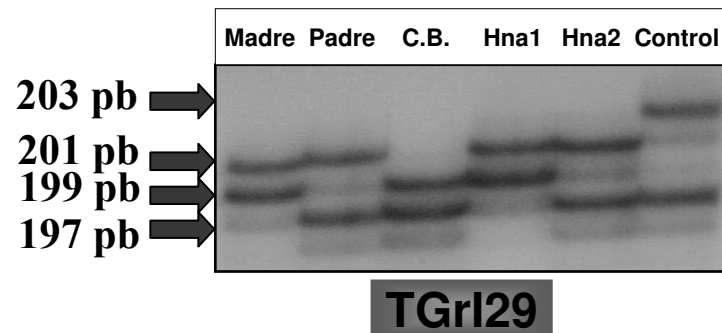
SSCP para validar nuevas mutaciones

Nueva deleción en el exón 10 : c.1297-1304delIGCCTGCCA

Paciente CB

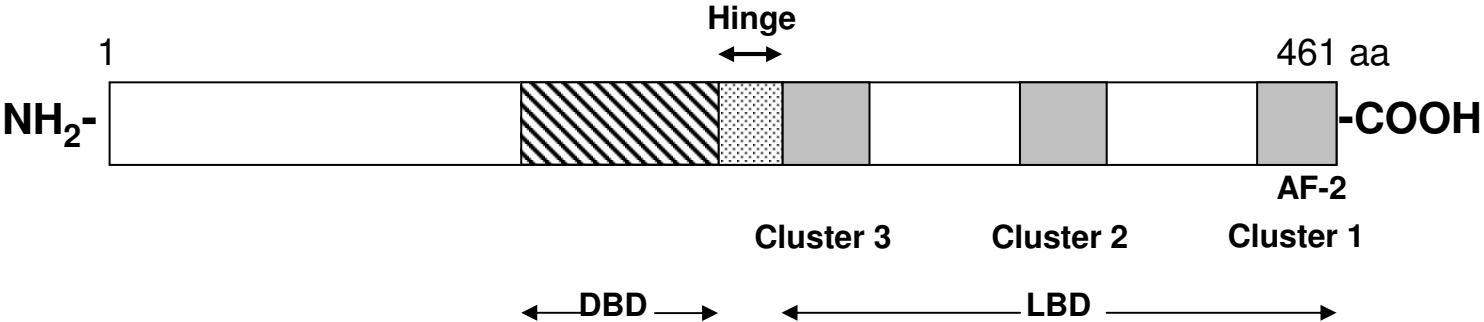


Análisis de microsatélites

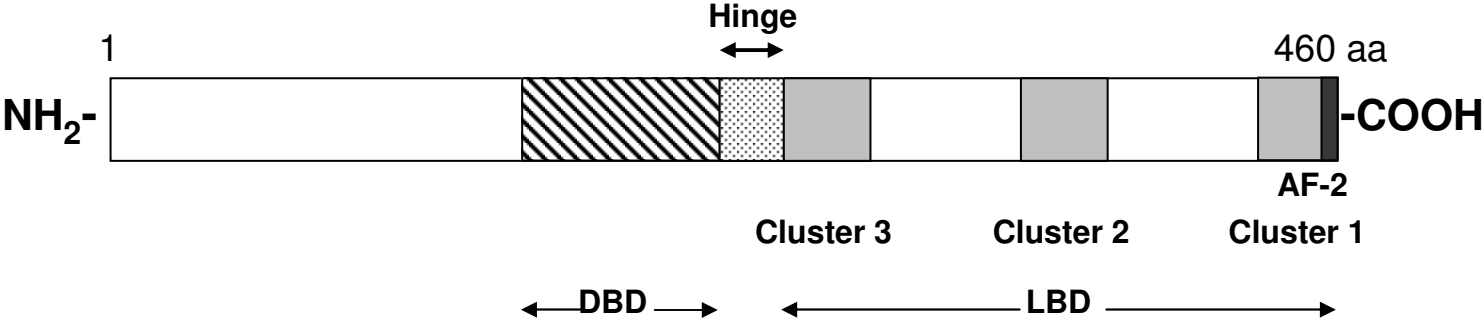


Paciente CB

Wild Type



1297-1304delIGCCTGCCA

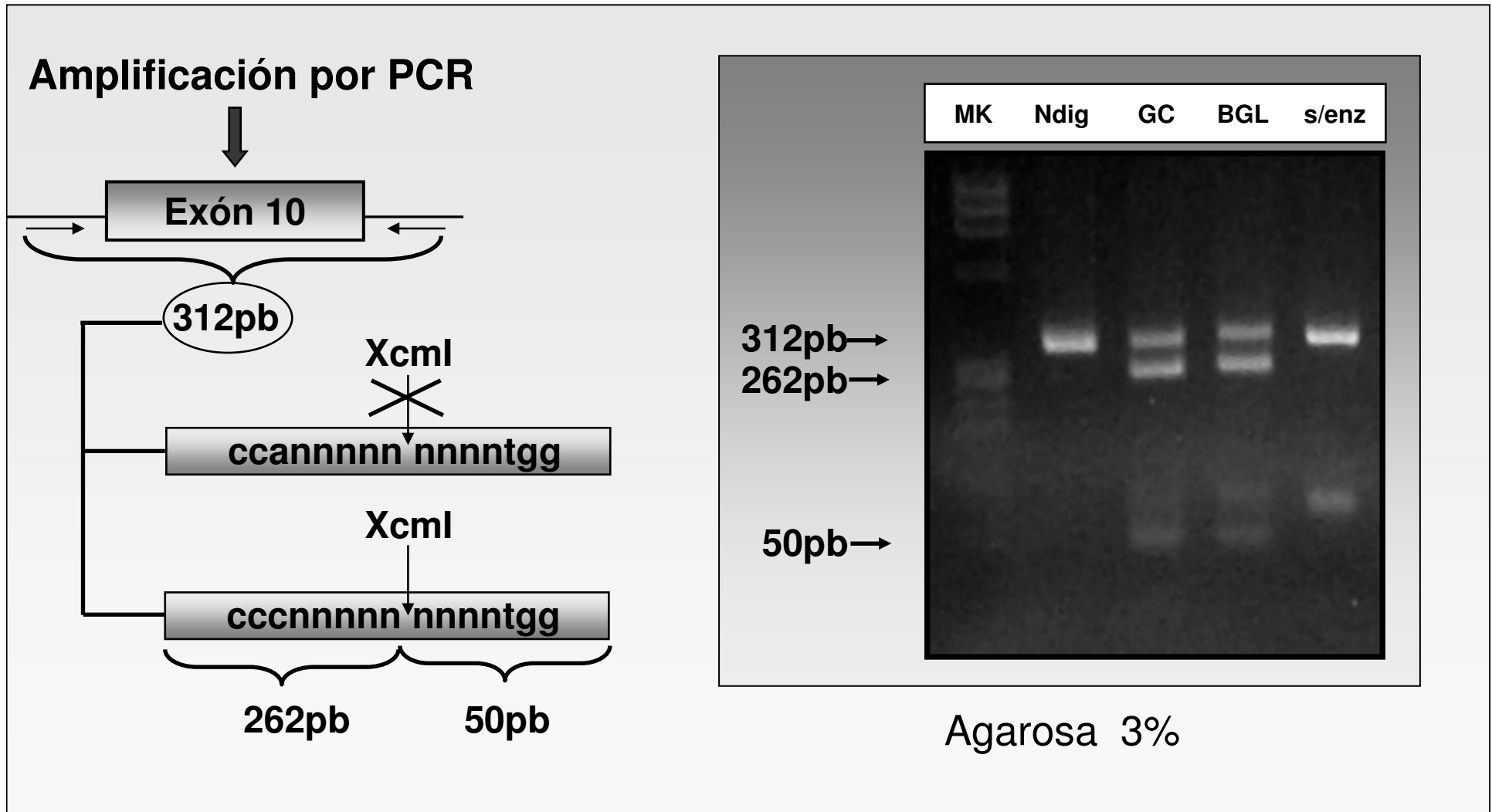


Mutaciones identificadas en el gen TR β

Exón	Pacientes	Mutaciones Nuevas		Instituciones
9	PC	c.991A>G (AAT>GAT)	p.N331D	H. Gutiérrez ARGENTINA
9	MF	c.1022T>C (CTG>CCG)	p.L341P	H. Gutiérrez ARGENTINA
9	AS	c.1036C>T (CTT>TTT)	p.L346F	H. Gutiérrez ARGENTINA
10	MA	c.1293A>G (ATA>ATG)	p.I431M	H. Garrahan ARGENTINA
10	CB	c.1297- 1304delGCCT GCCA	p.A433fs X461	H. Militar Central ARGENTINA
10	ED	c.1358C>T (CCT>CTT)	p.P453L	H. Gutiérrez ARGENTINA
10	MF	c.1339C>A (CCC>ACC)	p.P447T	H. R. Mejía ARGENTINA
9	EM	c.1003G>C (GCA>CCA)	p.A335P	IDIMI CHILE

Exón	Pacientes	Mutaciones conocidas		Instituciones
9	MA	c.1012C>T (CGG>TGG)	p.R338W	H. Garrahan ARGENTINA
10	GC	c.1357C>A (CCT>ACT)	p.P453T	H. Durán ARGENTINA
10	VB	c.1357C>A (CCT>ACT)	p.P453T	H. Eva Perón ARGENTINA
10	NL	c.1357C>A (CCT>ACT)	p.P453T	H. M. Central ARGENTINA
10	AE	c.1376T>G (TTC>TGC)	p.F459C	H. Clínicas Uruguay
8	GF	c.803C>G (GCC>GGC)	p.A268G	H. Clínicas ARGENTINA

Validación de la mutación p.P453T por digestión con XcmI



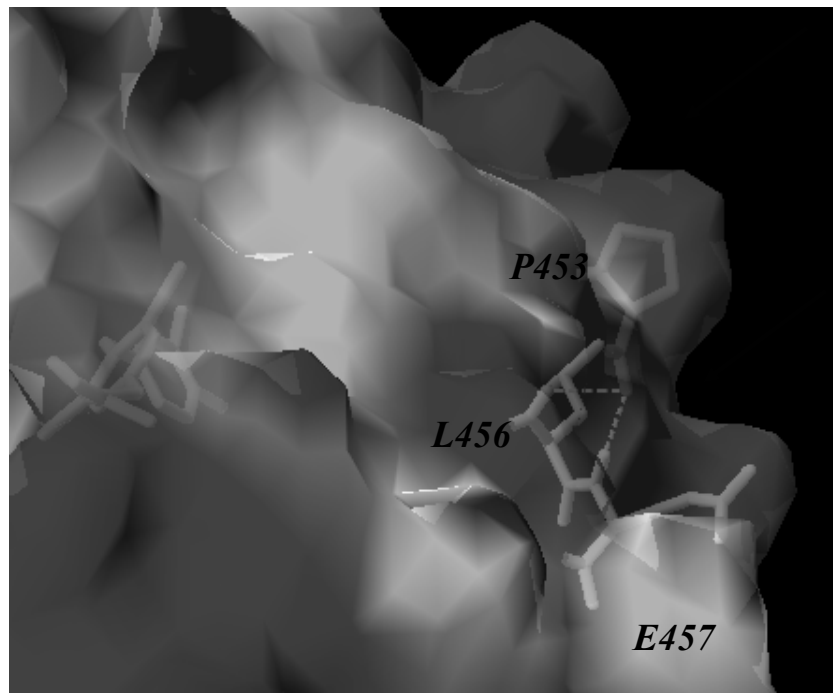
Análisis predictivo de la estructura secundaria del receptor

Exón 9

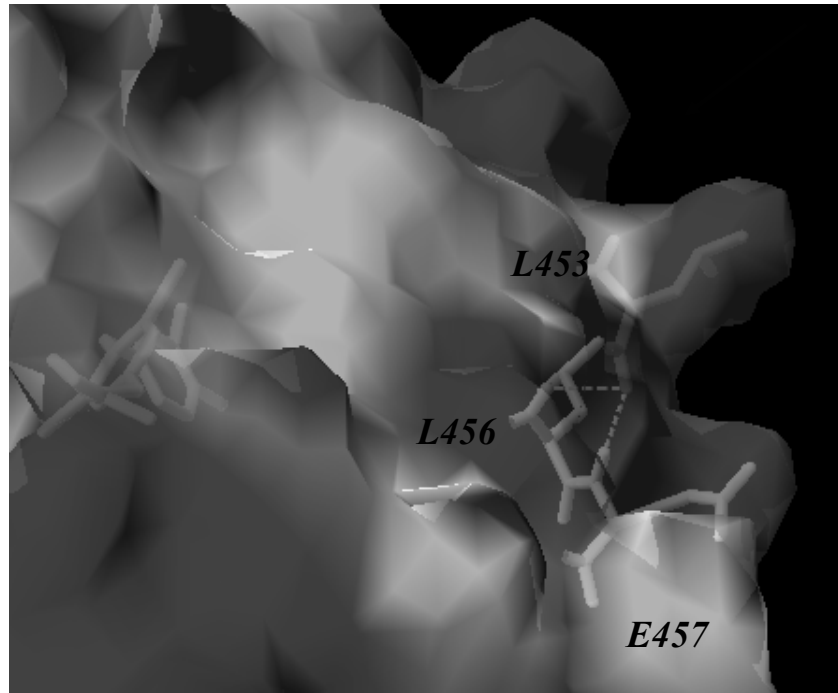
THR β -WT	QIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAVTRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSL
ESP	HHEE-----HHHHHHHH-----E-H---HHHH-----EEEE--EHHH----
	↓
THR β -N331D	QIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAVTRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSL
ESP	HHEE-----HHHHHHHH-----H---HHHH-----EEEE--EHHH----
	↓
THR β -R338W	QIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAVTWGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSL
ESP	HHEE-----HHHHHHHH-----E-H---HHHH-----EEEE--EHHH----
	↓
THR β -L341P	QIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAVTRGQPKNGGLGVVSDAIFDLGMSL
ESP	HHEE-----HHHHHHHH-----E-H---HEH-----EEEE--EHHH----
	↓
THR β -L346F	QIILLKGCCMEIMSLRAAVRYDPESETLTLNGEMAVTRGQLKNGGPGVVSDAIFDLGMSL
ESP	HHEE-----HHHHHHHH-----E-H---HHHH-----EEEE--EHHH----

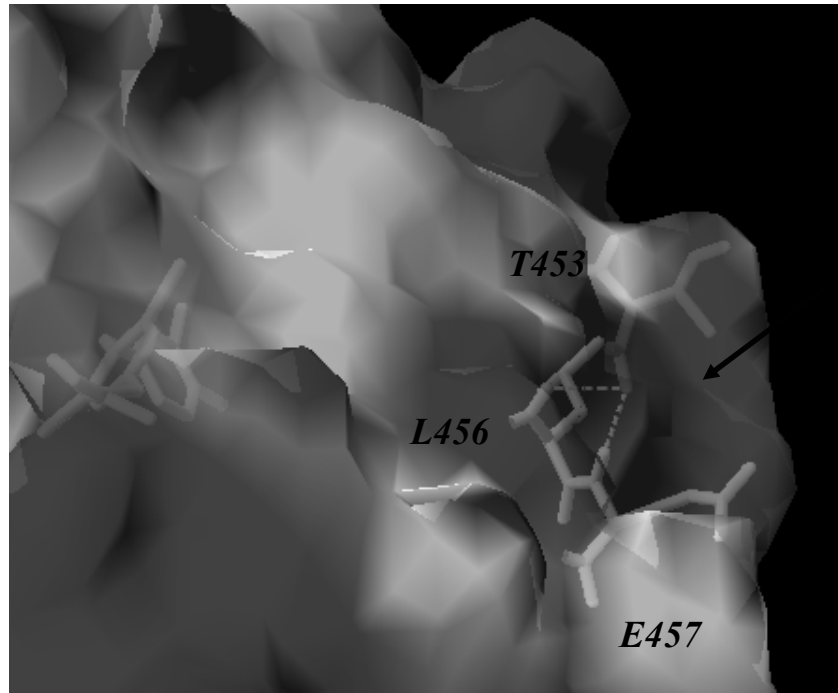
E: lámina β H: α hélice -: aa conectores

Determinación de Estructuras 3D



SWISS-MODEL





Conclusiones



El análisis poblacional indica que las mutaciones identificadas no se tratan de polimorfismos frecuentes.

El análisis de la estructura secundaria de las proteínas mutadas, los estudios evolutivos proteicos, modelado molecular permiten inferir que las mutaciones identificadas son de tipo inactivante.

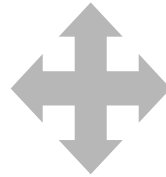
En el 90 % de casos de RTH no existen síntomas ni signos patognomónicos por lo cual la identificación de nuevas mutaciones en el gen $TR\beta$ aumentará la precisión en el diagnóstico y tratamiento de RTH.

Perspectivas



**Expresión in vitro de los alelos TR β
conteniendo las mutaciones identificadas.**

Binding a co-activadores



Binding a co-represores

**Determinación de la afinidad de las hormonas
tiroideas por los receptores mutados.**