

ESTUDIO DEL GEN *KRAS* EN CÁNCER DE PULMÓN

Marta Cuadros Celorrio (mcuadros@ugr.es)

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Grupo Gene regulation and Cancer (GENYO)

IBS_ Granada

Verónica Arenas Rodríguez (varenas@ugr.es)

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Objetivo:

Comprender la importancia del estudio genético en la práctica clínica, su valor diagnóstico, pronóstico y farmacológico.

Etapas:

Extracción del material genético (Práctica 1. Extracción ácidos nucleicos. Aplicaciones clínicas. Profa. Marta Cuadros Celorrio).

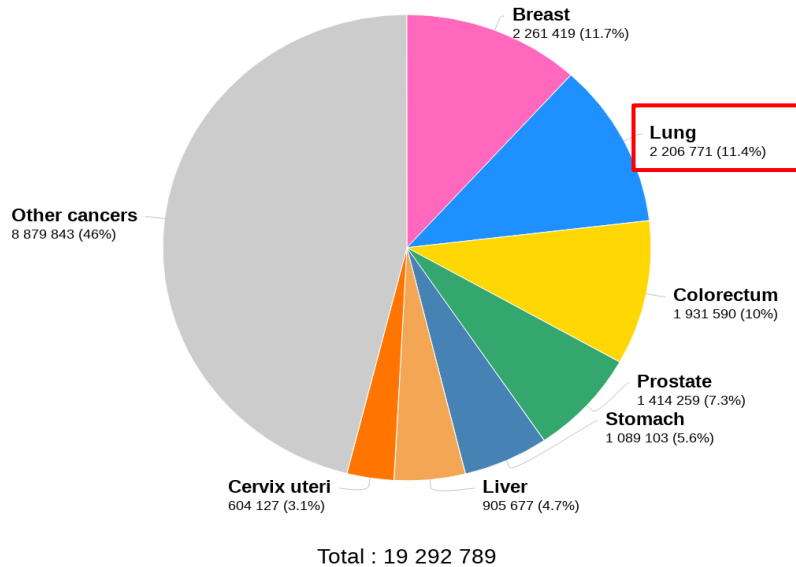
Diseño de oligonucleótidos para el estudio de mutaciones en el exon 2 de *KRAS* en muestras de cáncer de pulmón. Búsqueda de un control positivo (Seminario 1. Aplicación de herramientas bioinformáticas para el estudio de los genes y las enfermedades. Profa. María Soledad Benítez Cantos).

Amplificación de *KRAS*, valoración de los resultados. Implicación clínica (Práctica 2. Amplificación de fragmentos de ADN por PCR. Prof. Francisco Hernández Torres).

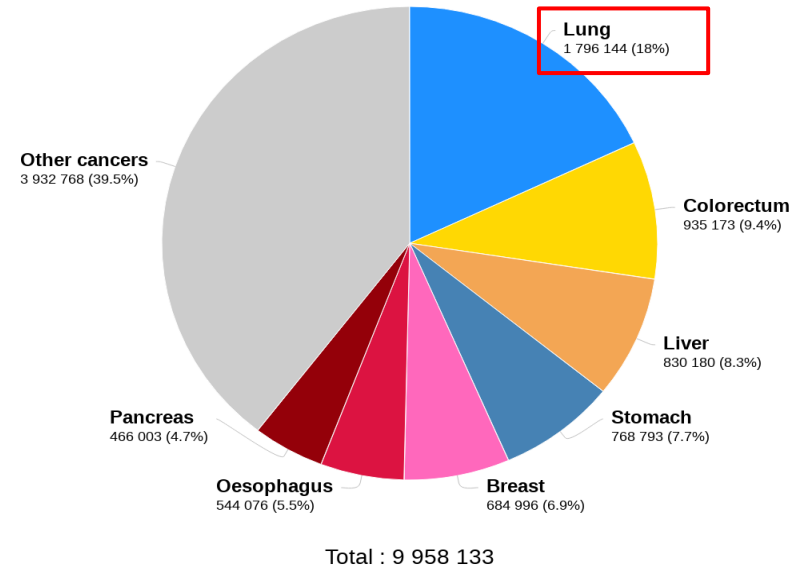
Cáncer de pulmón

Es el cáncer más mortal (\approx 1 de 5).

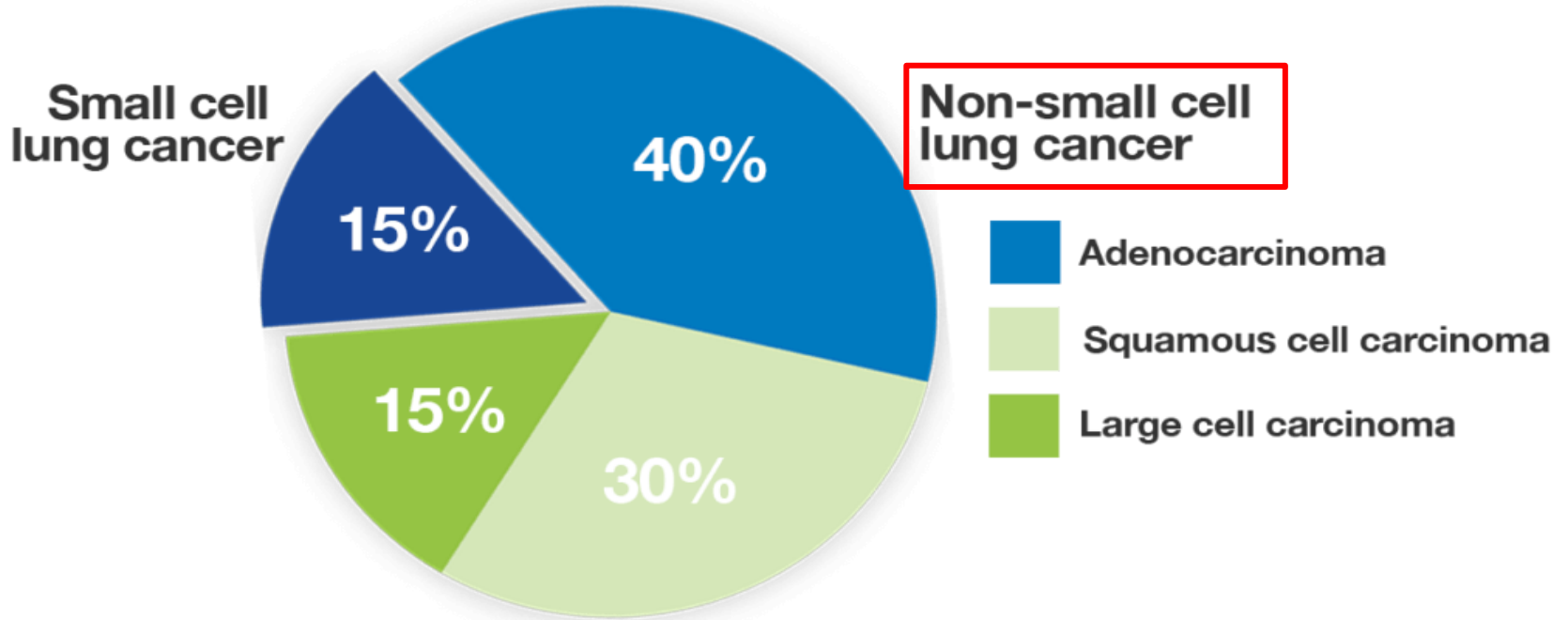
Incidencia



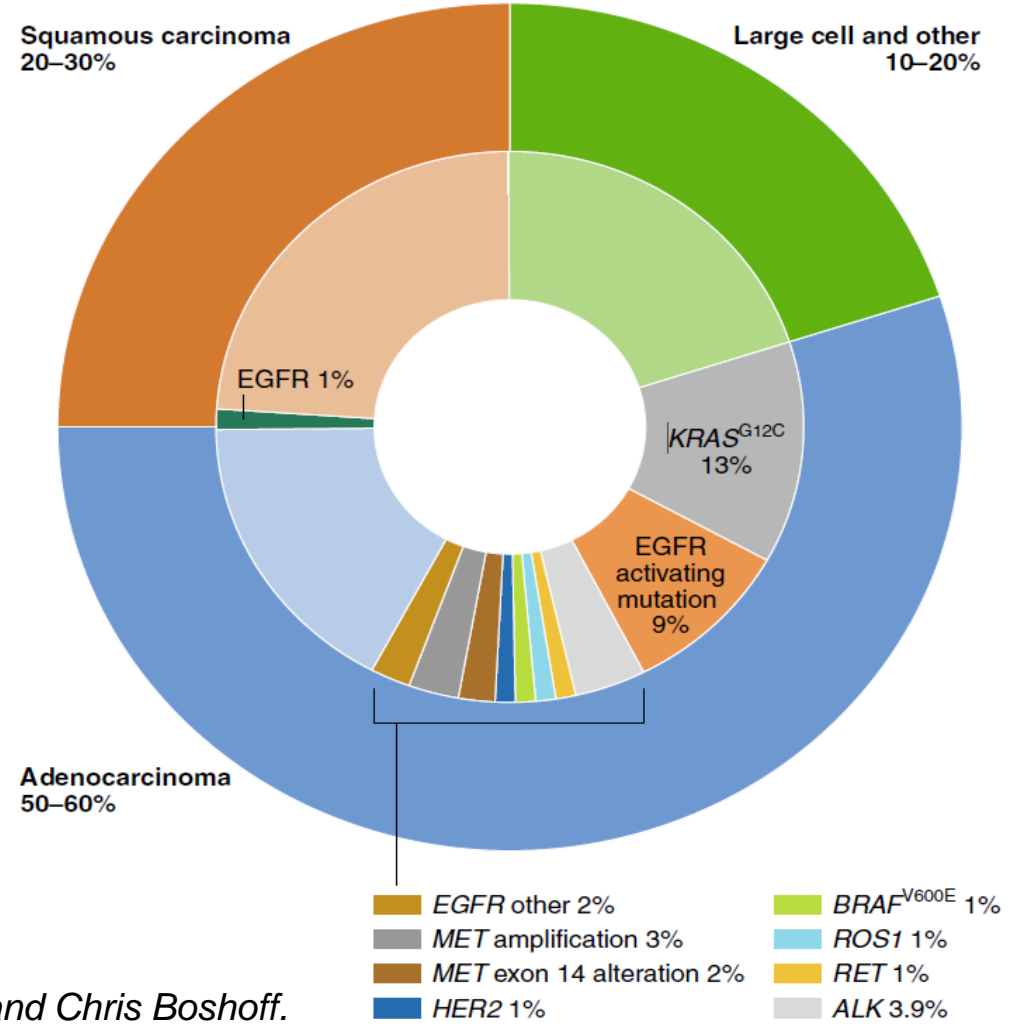
Mortalidad



Cáncer de pulmón

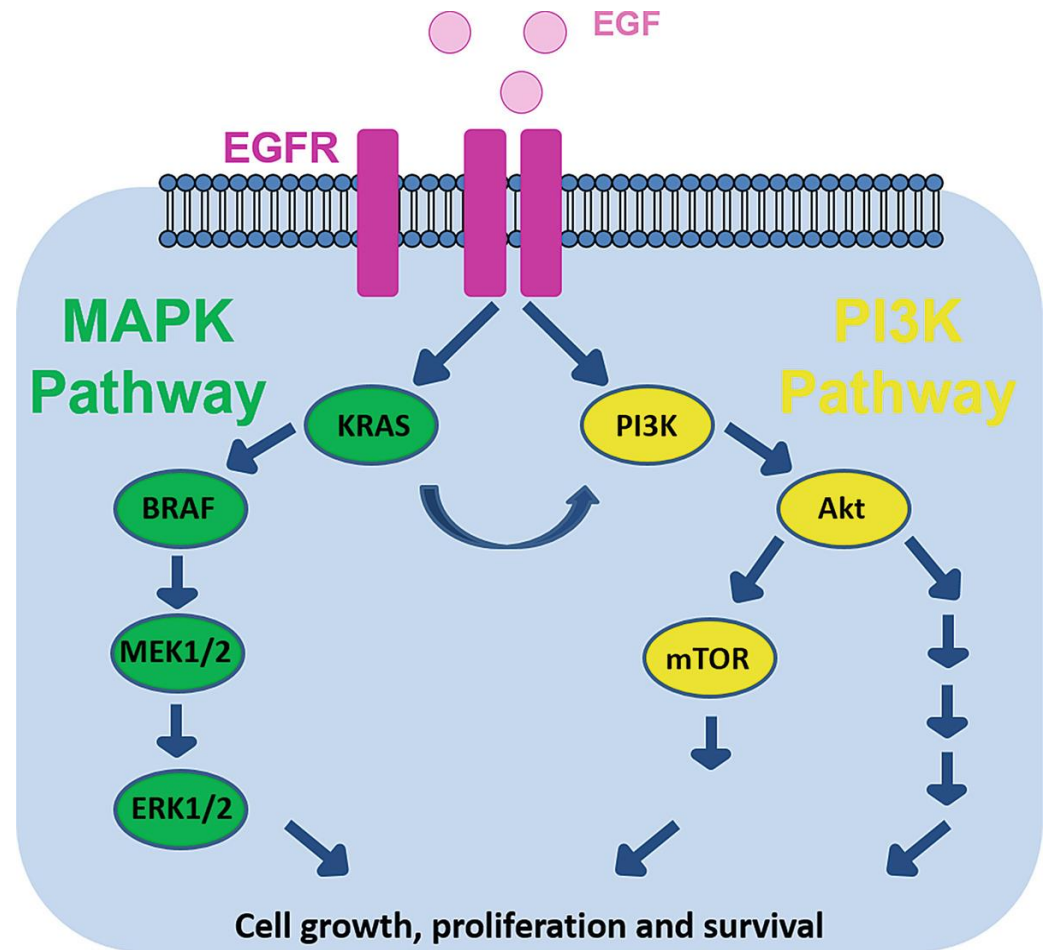
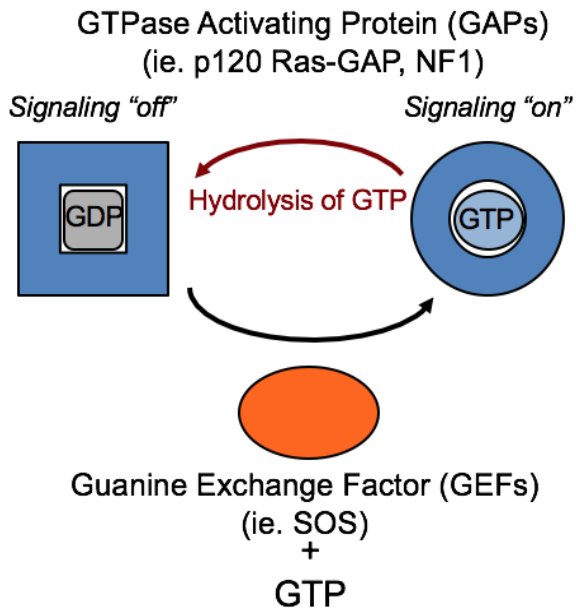


Cáncer de pulmón NSCLC

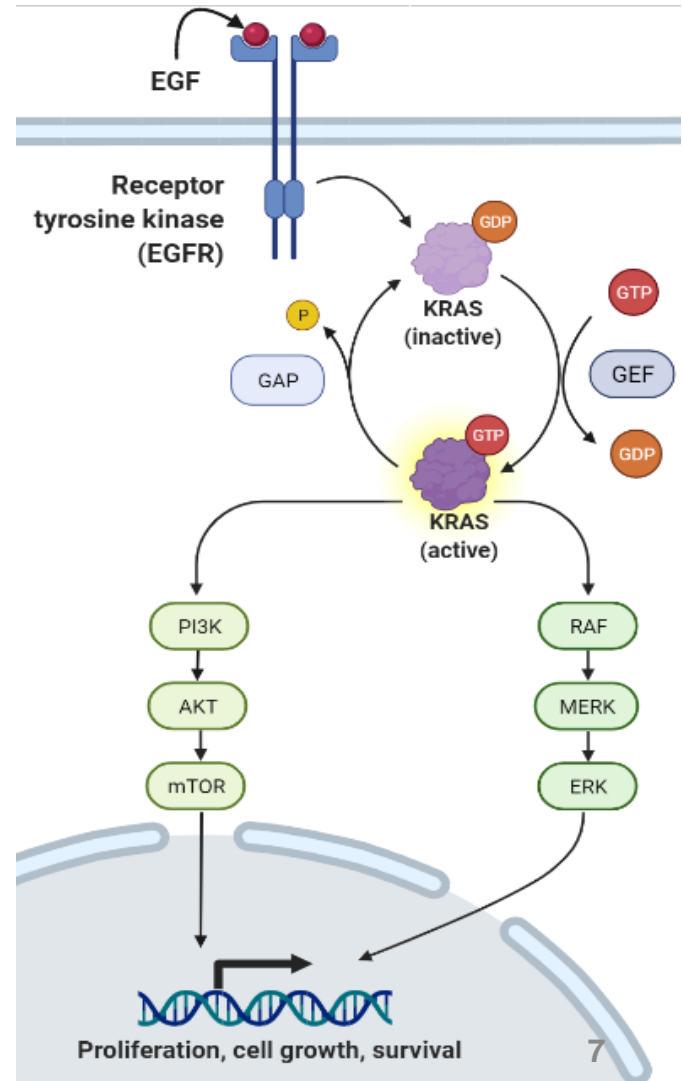
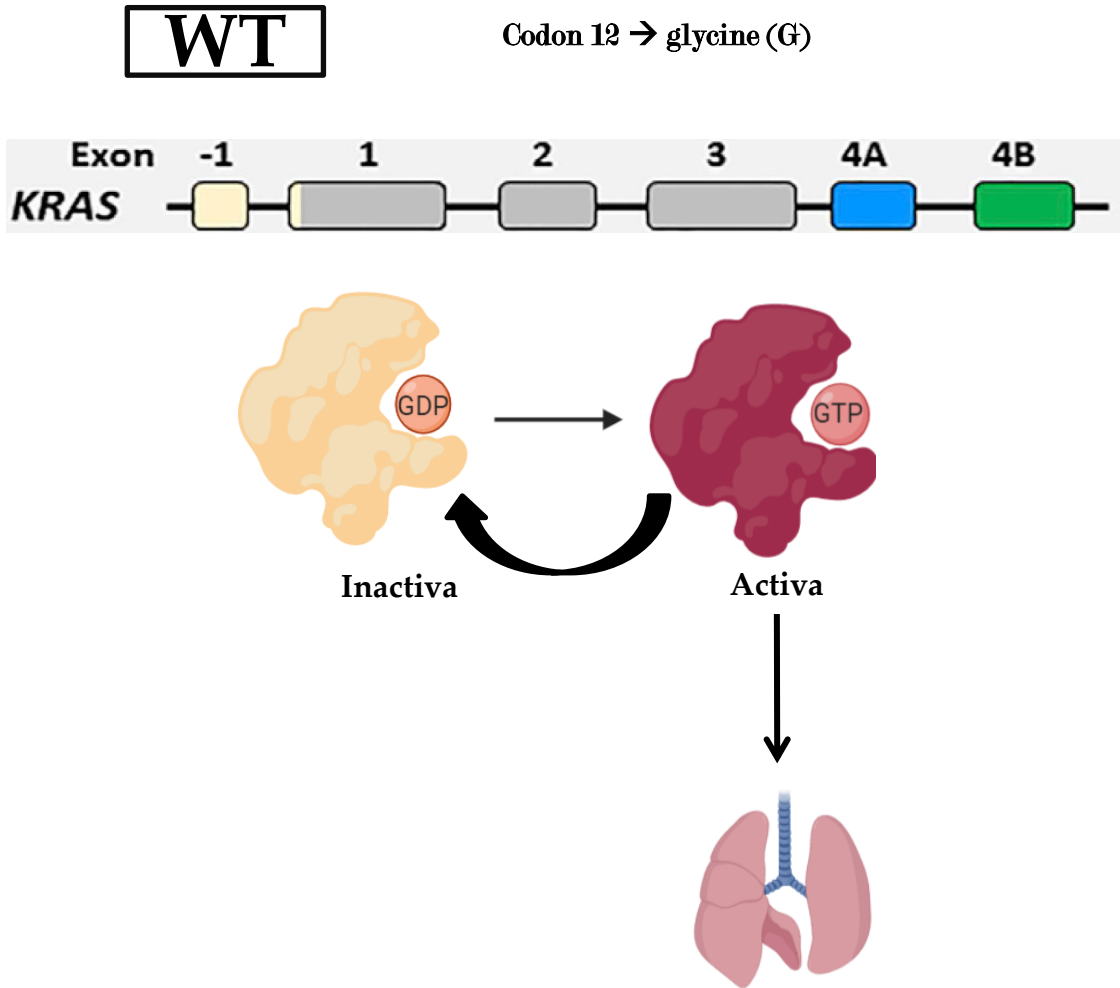


Meina Wang , Roy S. Herbst and Chris Boshoff.
Nature Medicine 2021; 27: 1345–1356

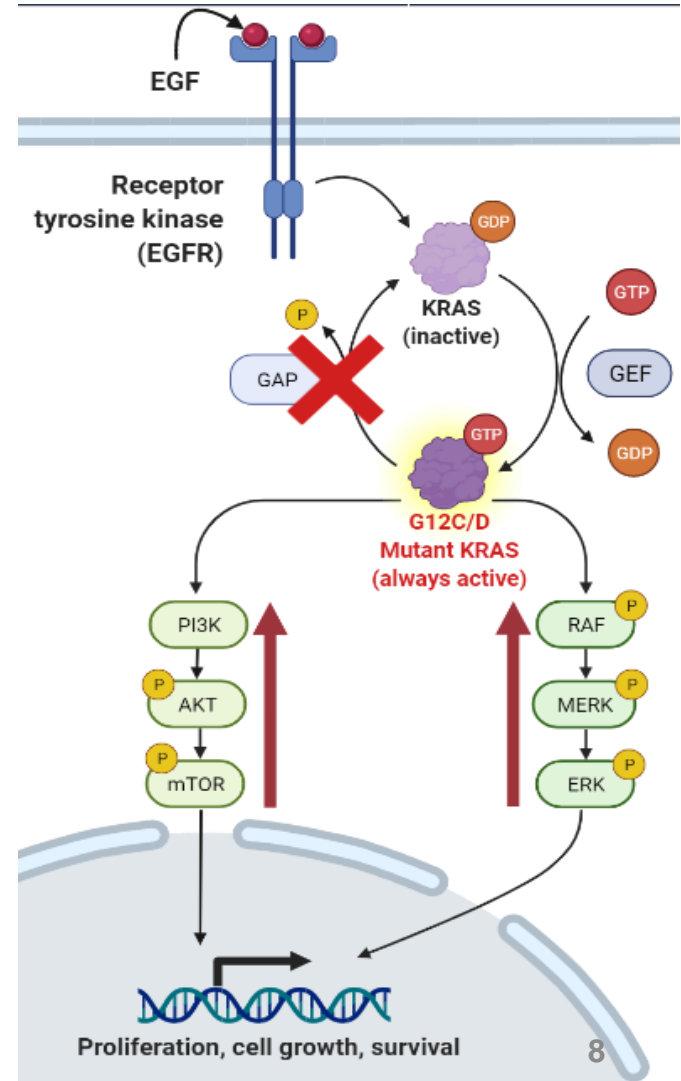
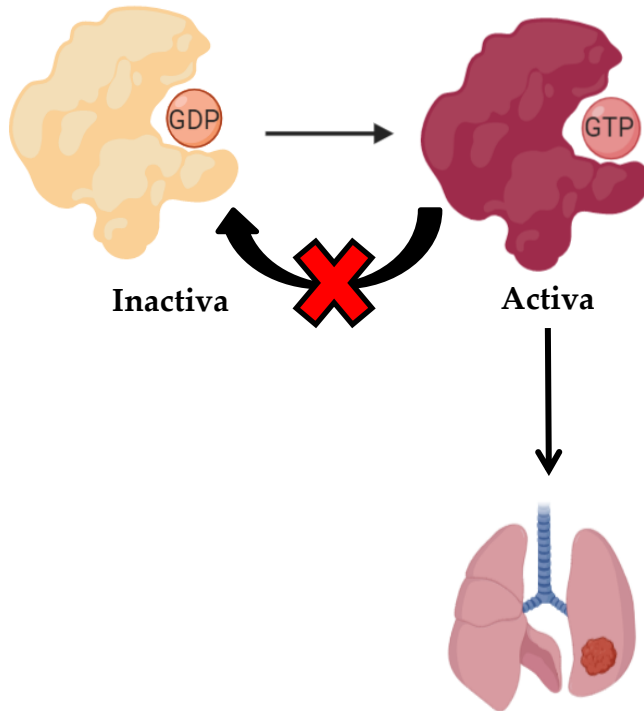
KRAS



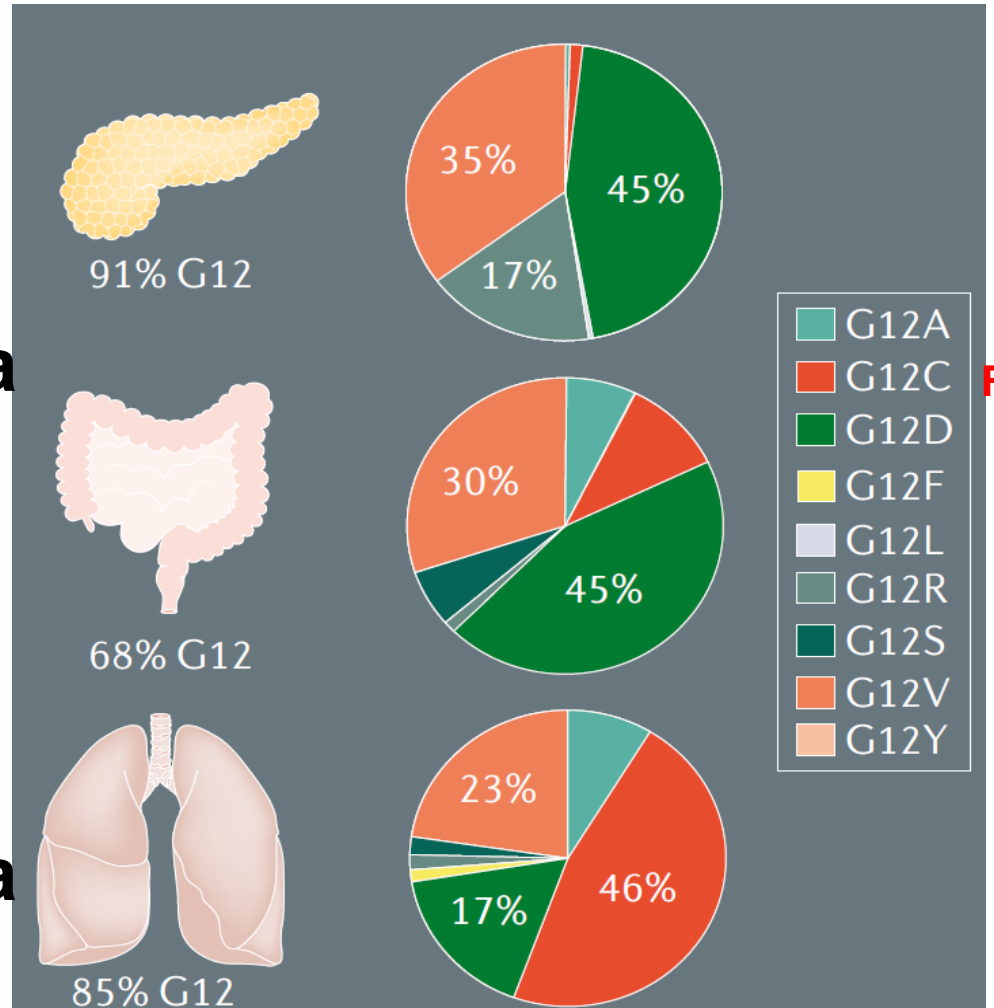
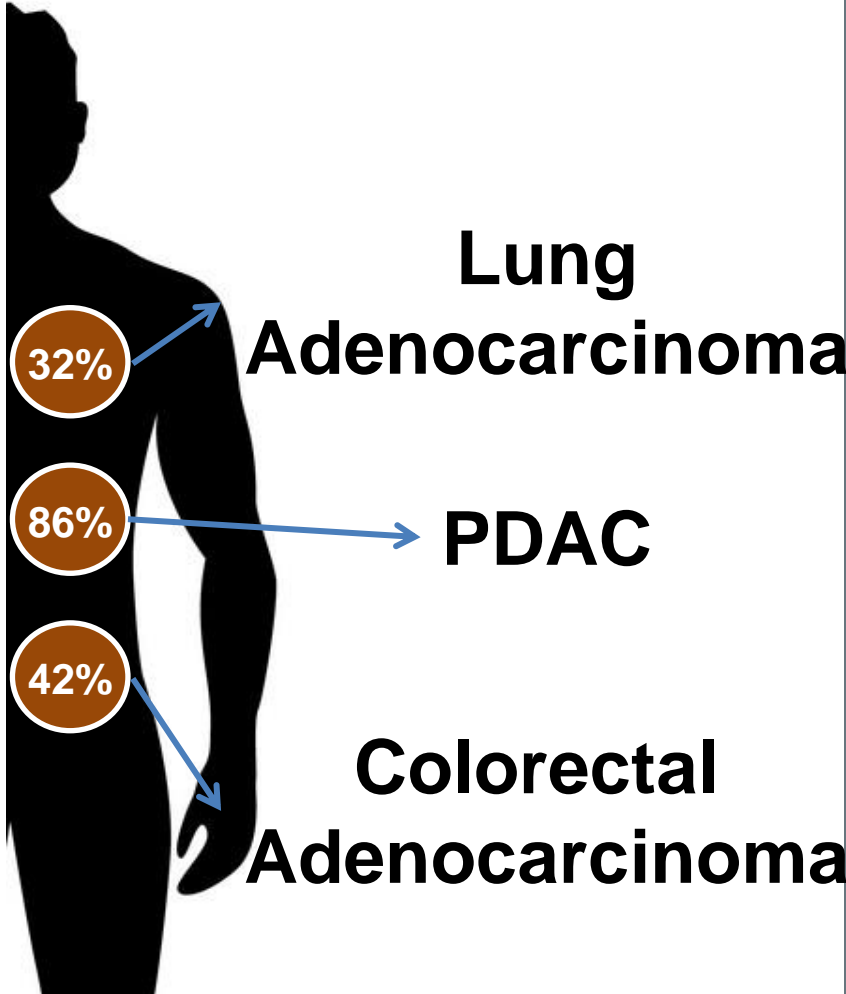
KRAS



KRAS



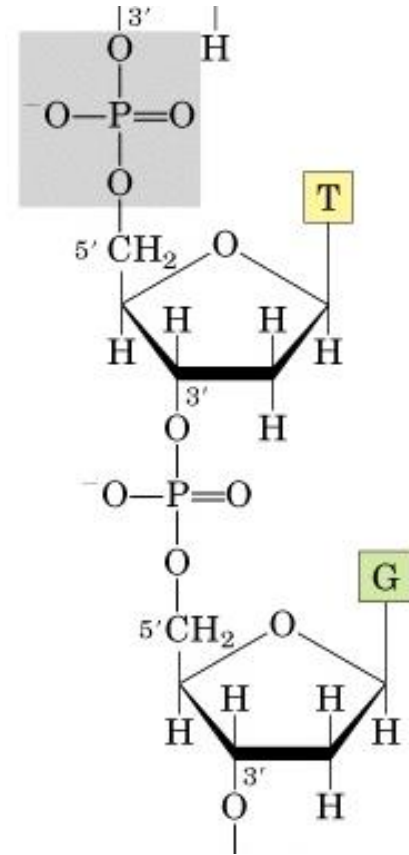
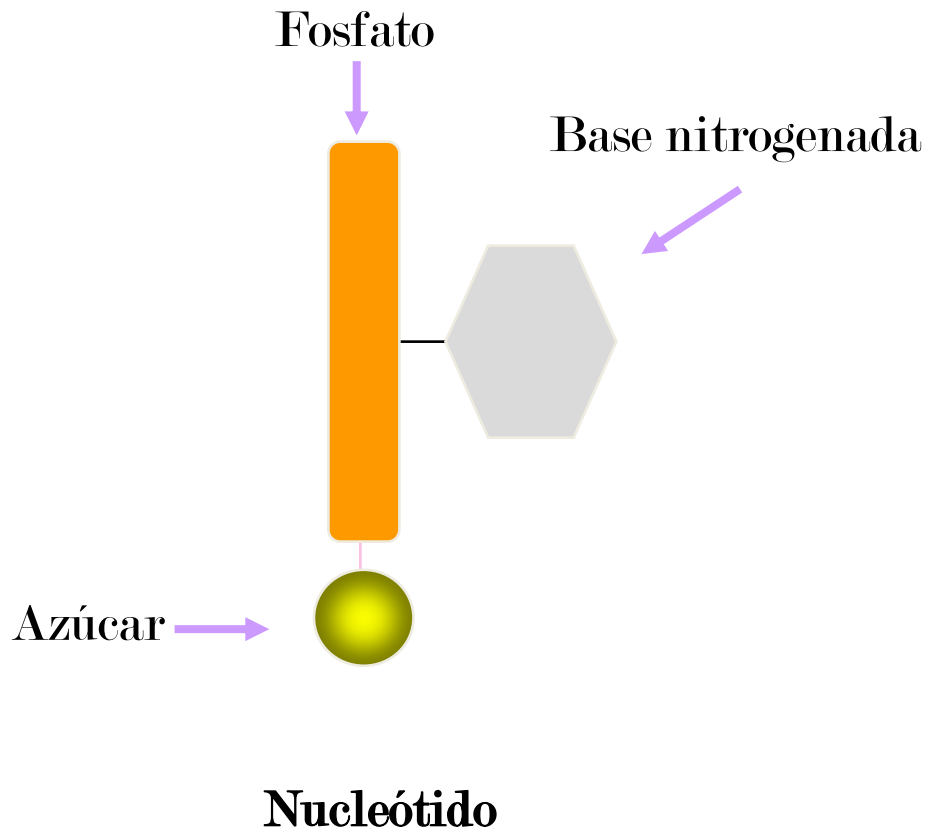
KRAS





Métodos de extracción y análisis de Ácidos Nucleicos

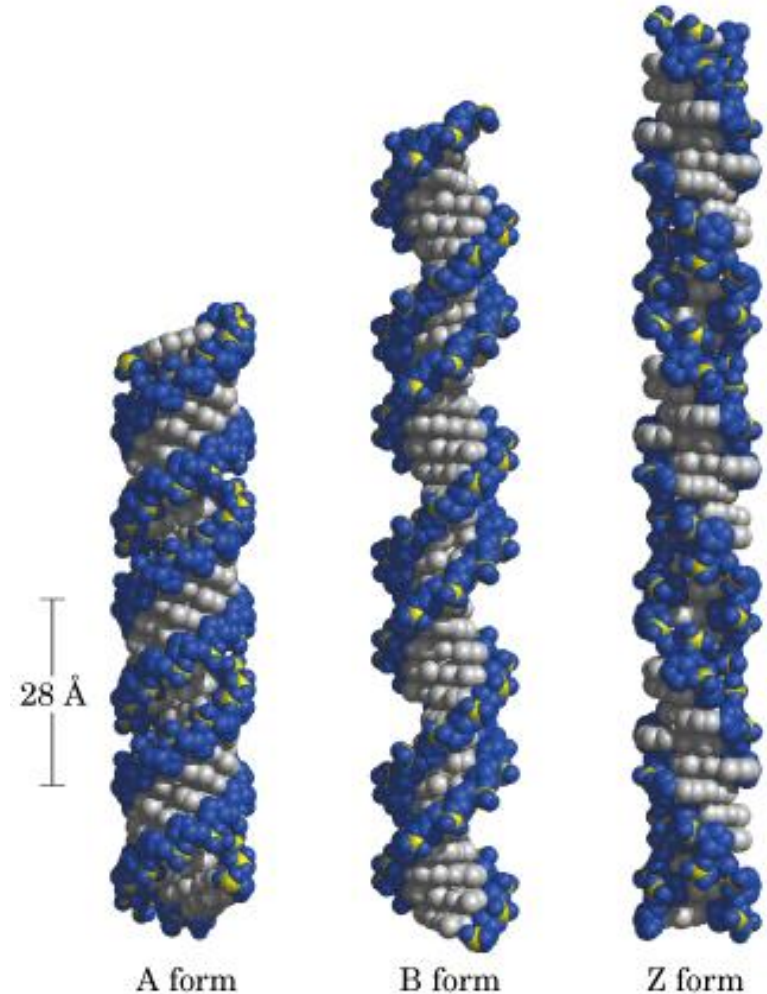
Estructura del ADN



Estructura del ADN

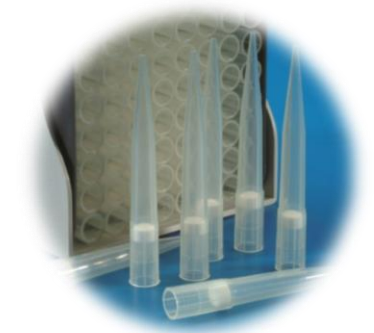
| | A form | B form | Z form |
|---|---------------|---------------|---|
| Helical sense | Right handed | Right handed | Left handed |
| Diameter | ~26 Å | ~20 Å | ~18 Å |
| Base pairs per helical turn | 11 | 10.5 | 12 |
| Helix rise per base pair | 2.6 Å | 3.4 Å | 3.7 Å |
| Base tilt normal to the helix axis | 20° | 6° | 7° |
| Sugar pucker conformation | C-3' endo | C-2' endo | C-2' endo for pyrimidines; C-3' endo for purines |
| Glycosyl bond conformation | Anti | Anti | Anti for pyrimidines; syn for purines |

Figure 8-17 part 2
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company



¿Cómo trabajar en un laboratorio?

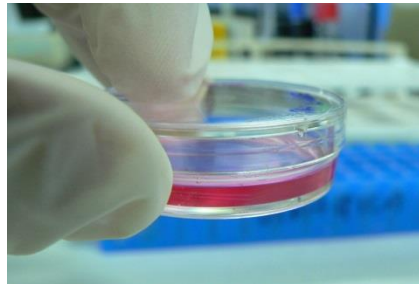
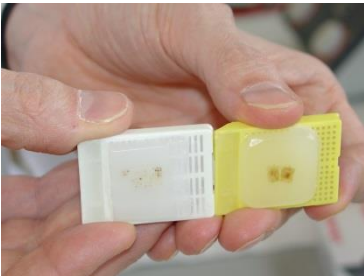
- Separación de áreas.
- Separación de materiales.
- Evitar contaminación:
 - Controles negativos (NTC) y positivos.
 - Esterilización de material.
 - Uso de campanas.
 - Uso de alícuotas.
 - Tipaje del personal (identificación humana).



¿De dónde obtenemos ADN/ARN?



- ✓ Sangre: líquida o manchas.
- ✓ Tejidos en parafina.
- ✓ Fluidos corporales: saliva, semen, etc.
- ✓ Células en cultivo.



Objetivos extracción ADN

- ✓ Obtener cantidad de ADN.
- ✓ Calidad (integridad) de ADN.
- ✓ Pureza (ausencia contaminantes).

Extracción ADN

Homogeneización tejidos. Métodos físicos:

- ✓ Frío.
- ✓ Manual: mortero y pistilo de cerámica autoclavados (nieve carbónica).
- ✓ Mecánicas: bolas magnéticas de acero autoclavadas.



<https://www.youtube.com/watch?v=y7Nz6FgZdOc>



Extracción del ADN

lisis celular
inactivar nucleasas
separar los ácidos nucleicos

Manual:

- ✓ **Proteinasa K:** digiere tejidos y células.
- ✓ **SDS:** solubiliza membranas y desnaturaliza proteínas.
- ✓ **Fenol-cloroformo:** fases.
- ✓ **Sal (ClNa) + etanol:** precipitación.

Métodos:

- ✓ **DNAzol.**
- ✓ **Columnas.**
- ✓ **Alta salinidad.**

Proceso de ruptura de la doble membrana lipídica citoplasmática, nuclear o bien lipídica y mitocondrial dejando así libre el ADN que se encuentra en su interior.

Lisis celular

Ruptura mecánica, tratamiento químico (ejem: detergentes) o digestiones enzimáticas (ejem. proteinasa K).

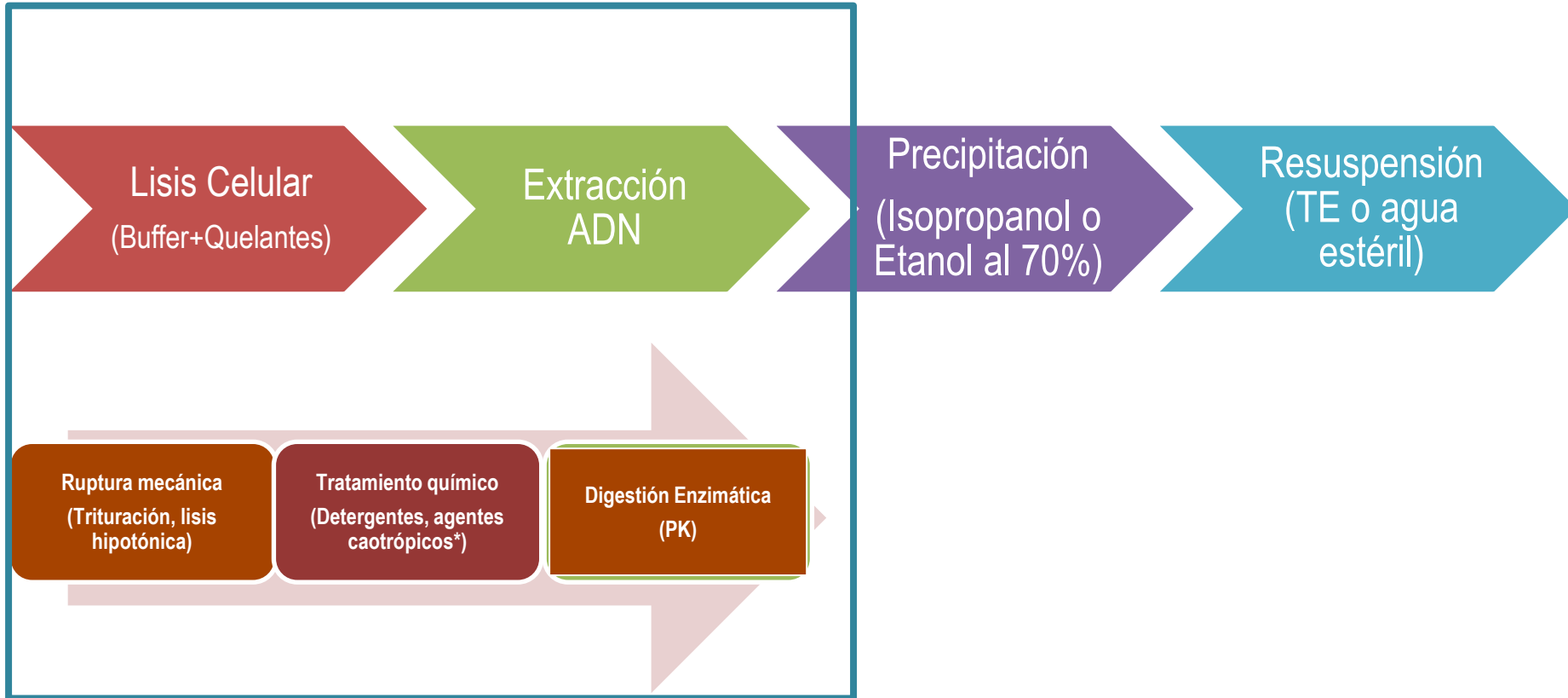
Ruptura de las membranas principalmente por choques hipotónicos bien por métodos orgánicos (fenol-cloroformo isoamílico) o bien por la gran cantidad de kits comerciales existentes.

Ruptura de las proteínas que mantienen empaquetado y condensado el ADN (proteínas histónicas y no histónicas) mediante el uso de proteasas.

Lavados que mediante filtración permiten romper/eliminar los restos celulares que no nos interesan.

Finalmente, obtenemos un eluido del ADN en un disolvente.

Resumen fases extracción



Centrifugaciones con rpm elevadas. Colocar siempre los tubos en la misma posición en la centrífuga por si no se apreciase el pellet, “suponer dónde estaría”.



Pellet ARN

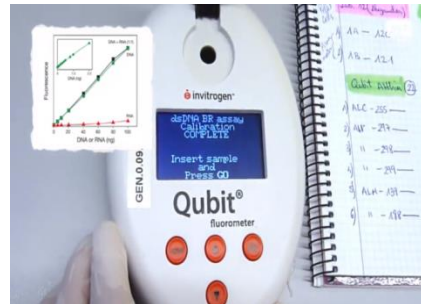
Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Depende mucho del tipo de material de origen y de las condiciones de extracción.

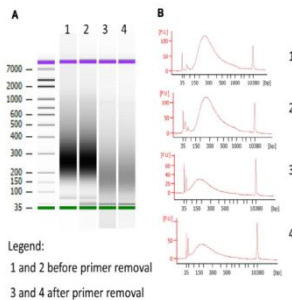
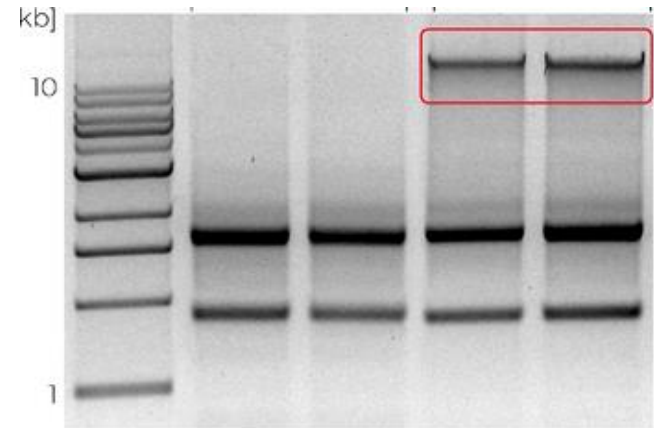
Nanodrop



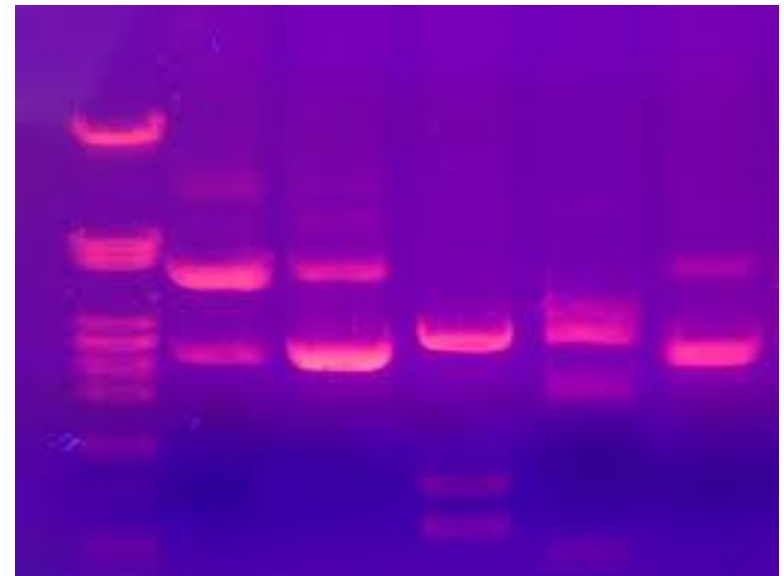
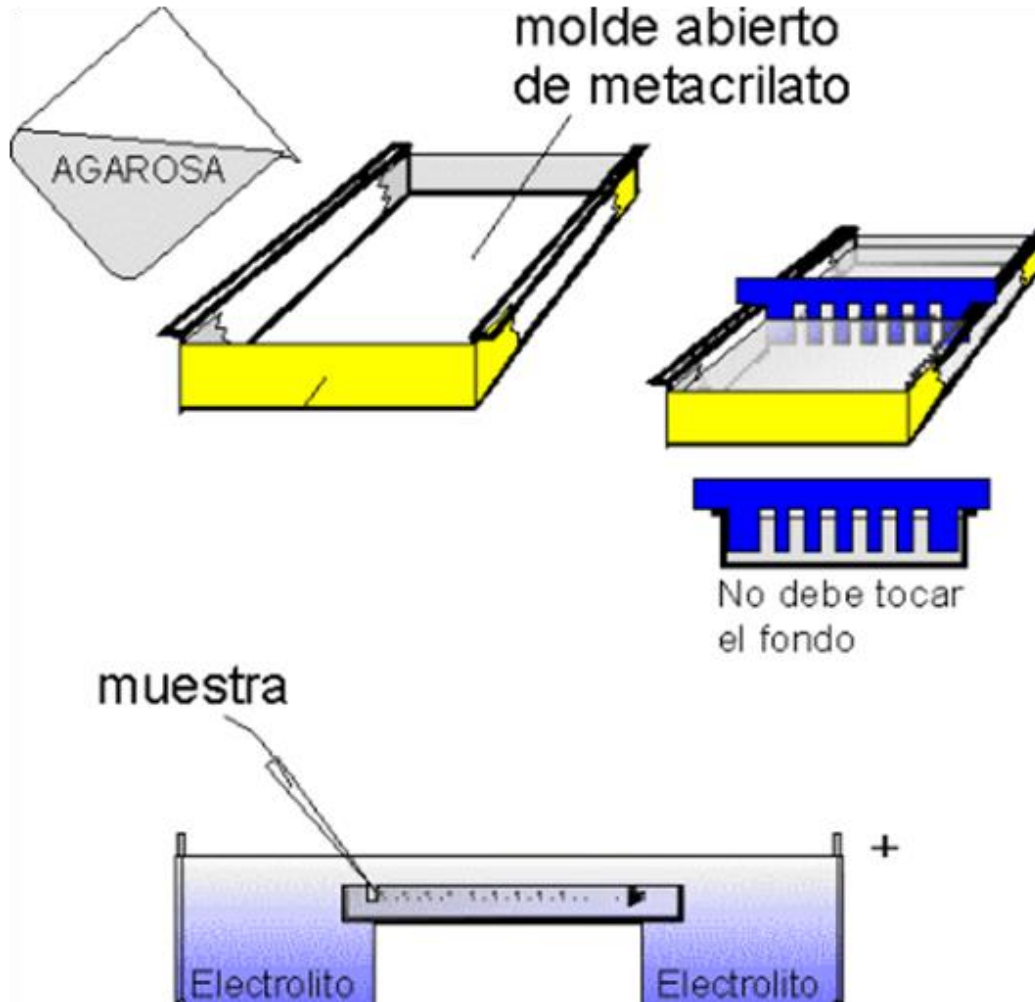
NanoQuant



DNA



Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

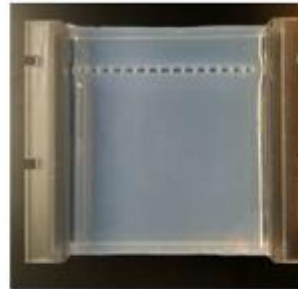


Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Elementos de la electroforesis



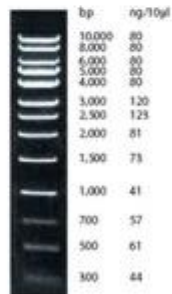
Cámara de electroforesis



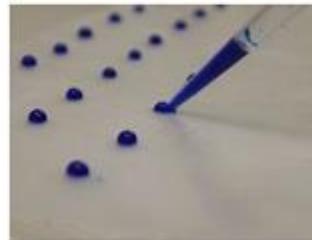
Gel de agarosa (1 – 2 %)



Buffer



Marcador peso molecular



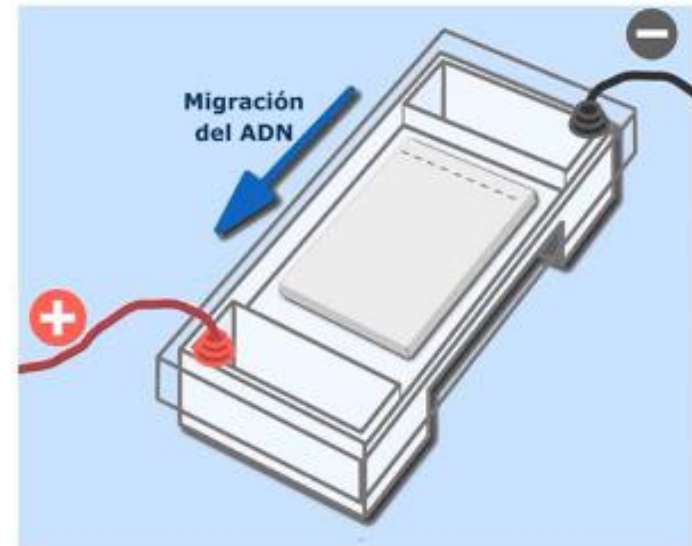
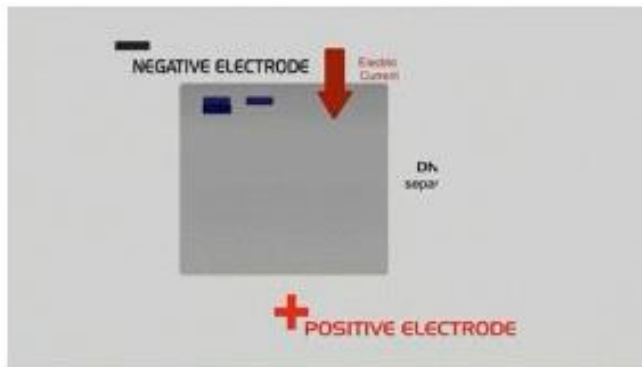
Buffer de carga



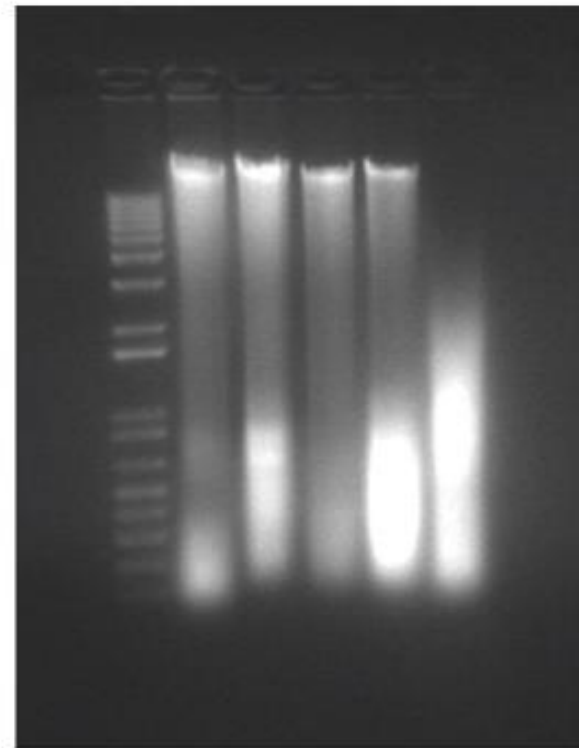
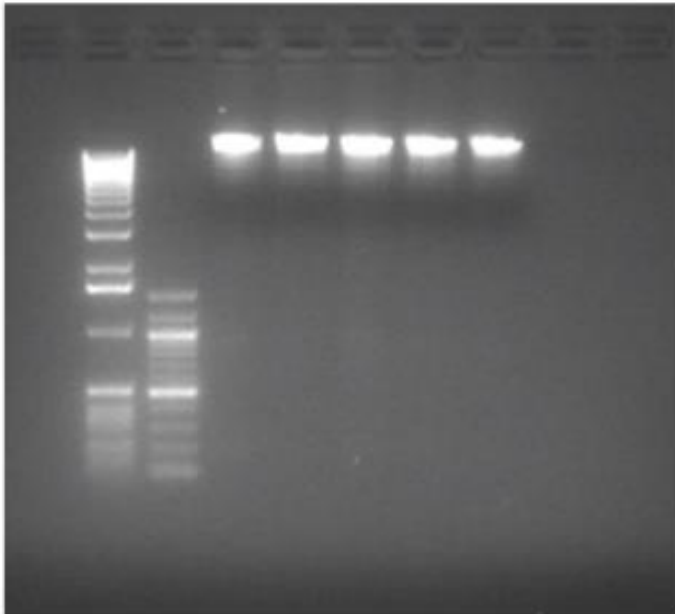
Transiluminador

Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Las biomoléculas poseen una carga eléctrica (ADN negativa), estas se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula.



Análisis de cantidad y calidad del ADN

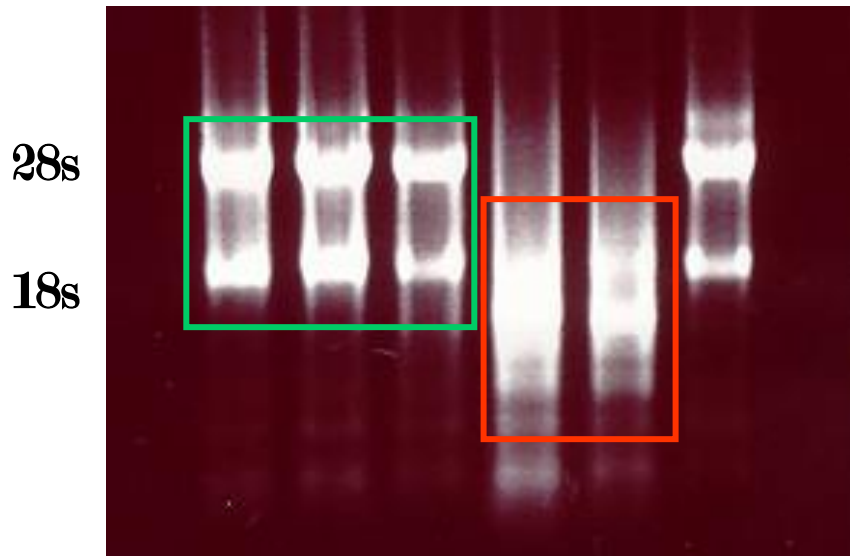


Análisis de cantidad y calidad del ARN

Calidad del ARN. Gel agarosa 1% ARN desnaturalizado con formamida y 65 C/5 min.

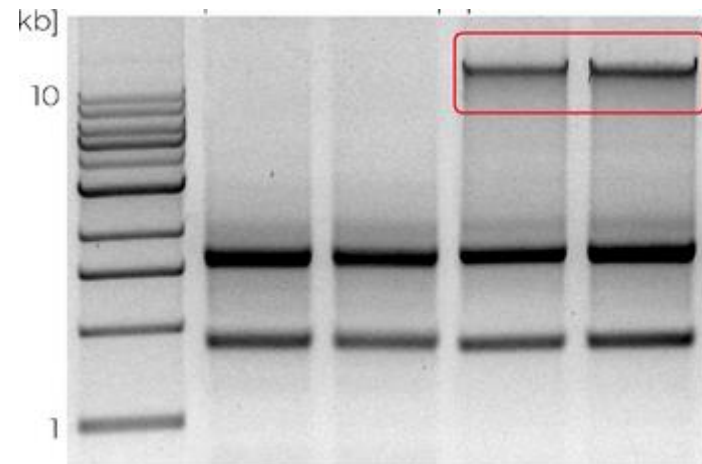
Depende mucho del tipo de material de origen y de las condiciones de extracción.

RNA íntegro



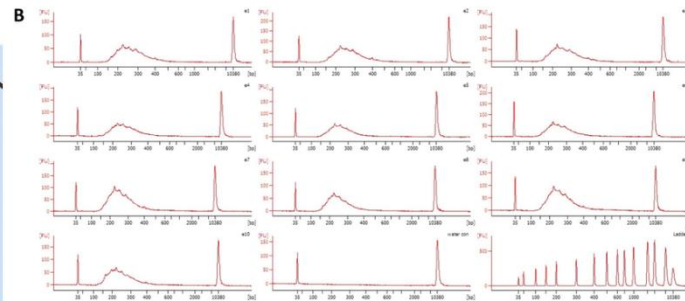
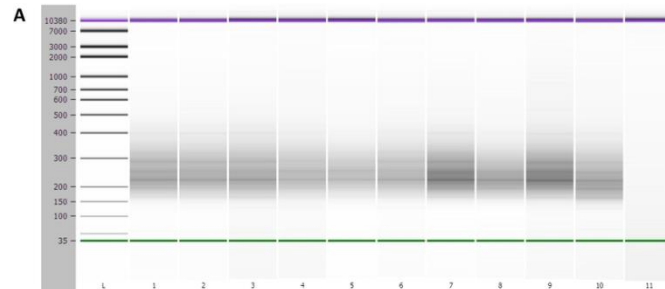
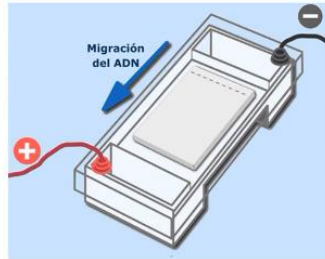
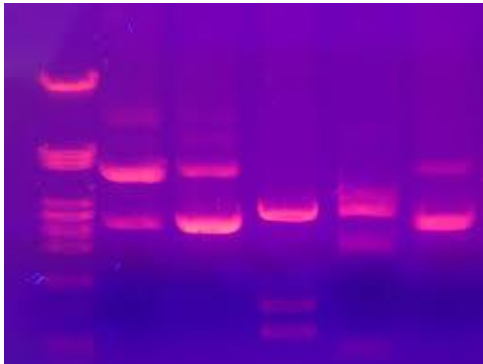
**RNA
degradado**

DNA



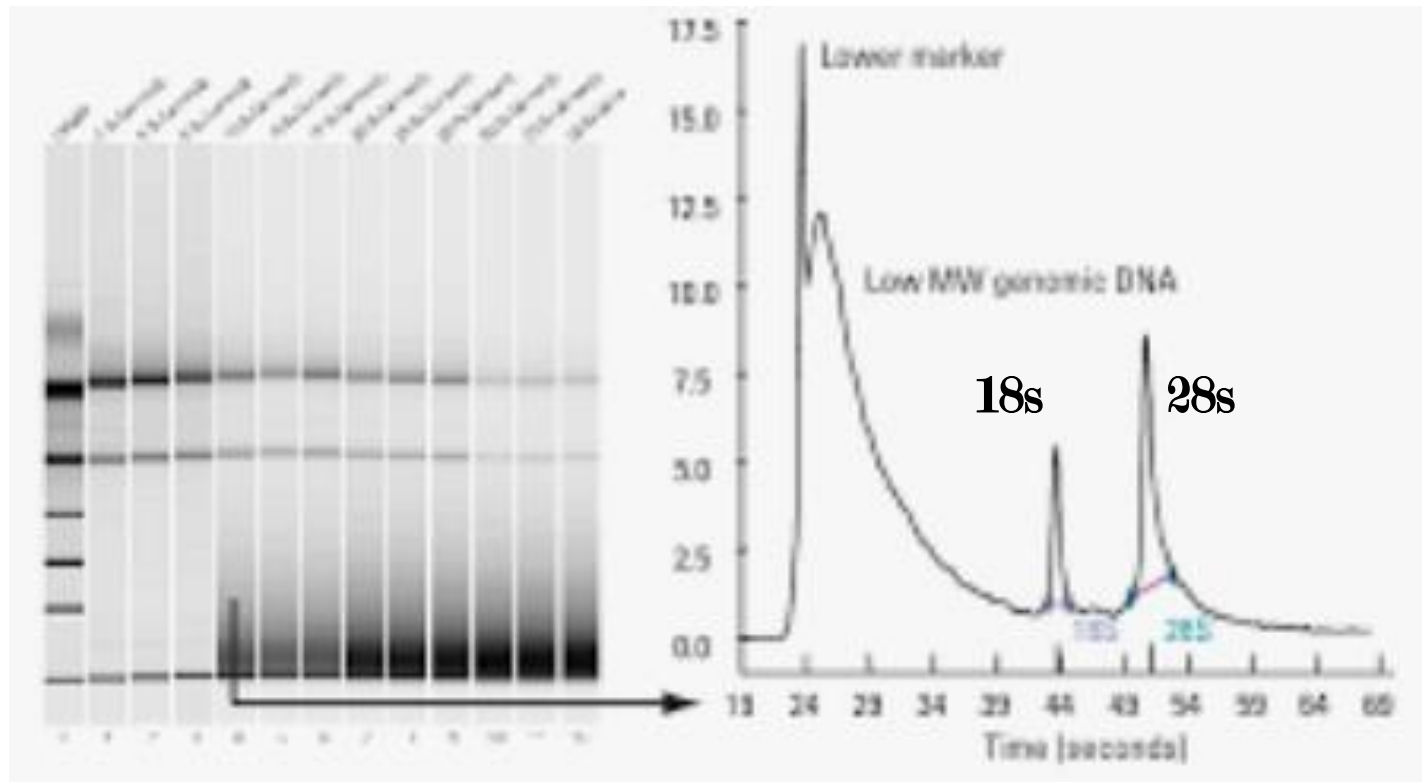
Descontaminar antes y después de trabajar

Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN



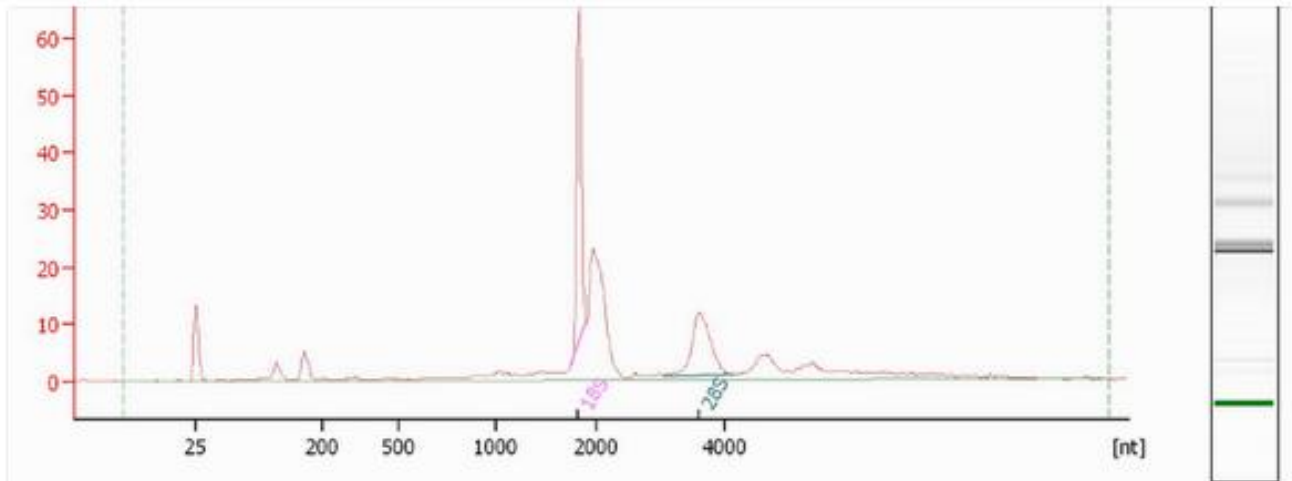
Análisis de cantidad y calidad del ARN

Calidad del ARN. Agilent 2100 Bioanalyzer.



Análisis de cantidad y calidad del ARN

Calidad del ARN. Agilent 2100 Bioanalyzer.



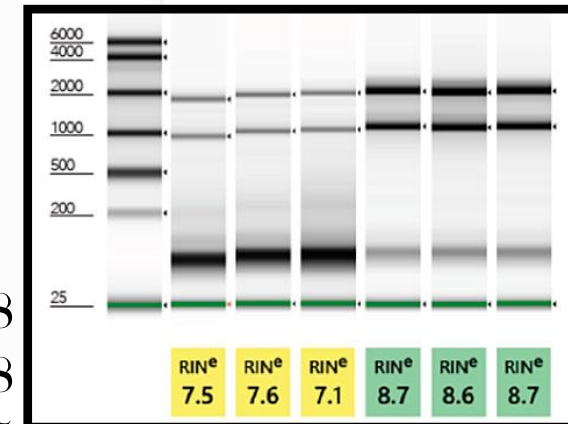
Overall Results for sample 1 : MG UNFED 6/6

| | | | |
|-------------------------|----------|-----------------------------|---|
| RNA Area: | 203.8 | RNA Integrity Number (RIN): | 8.5 (B.02.08) |
| RNA Concentration: | 90 ng/µl | Result Flagging Color: | |
| rRNA Ratio [28s / 18s]: | 0.6 | Result Flagging Label: | RIN: 8.50 |

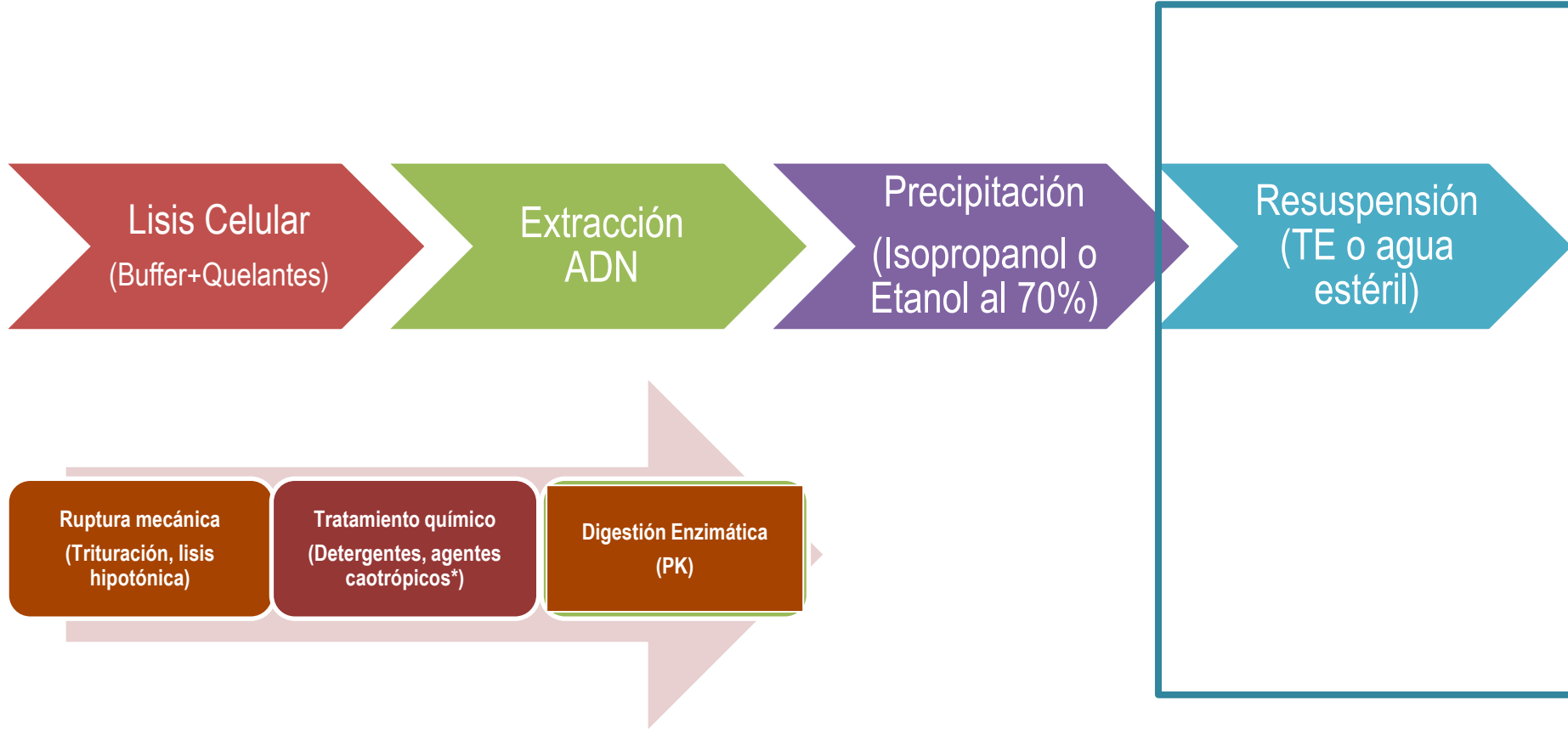
Fragment table for sample 1 : MG UNFED 6/6

| Name | Start Size [nt] | End Size [nt] | Area | % of total Area |
|------|-----------------|---------------|------|-----------------|
| 18S | 1,746 | 1,894 | 41.5 | 20.4 |
| 28S | 3,030 | 4,150 | 24.5 | 12.0 |

Alta calidad >8
Media: 6-8
Degradación: <5



Resumen fases extracción



Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Cuantificación.

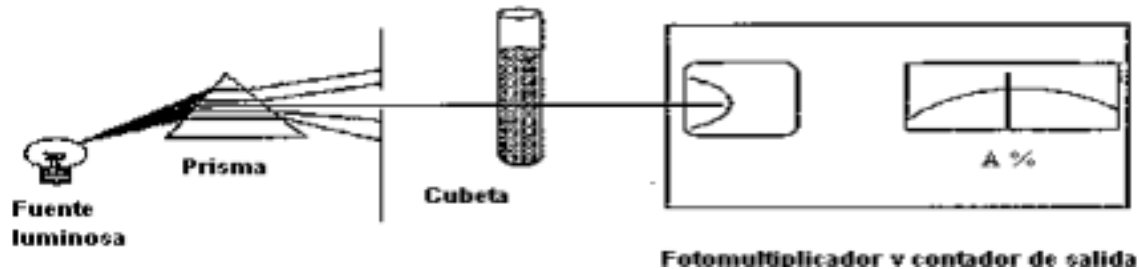
Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas. La absorción de UV es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración.

| A260: 1 | ($\mu\text{g}/\text{mL}$) |
|-----------------|-----------------------------|
| Doble hebra ADN | 50 |
| 1 hebra ADN | 33 |
| ARN | 40 |
| Oligonucleótido | 20-30 |

||||| USAR UN BLANCO!!!!!!

Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

El espectrofotómetro se fundamenta en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. El aparato funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra.



Cada molécula absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución.

Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

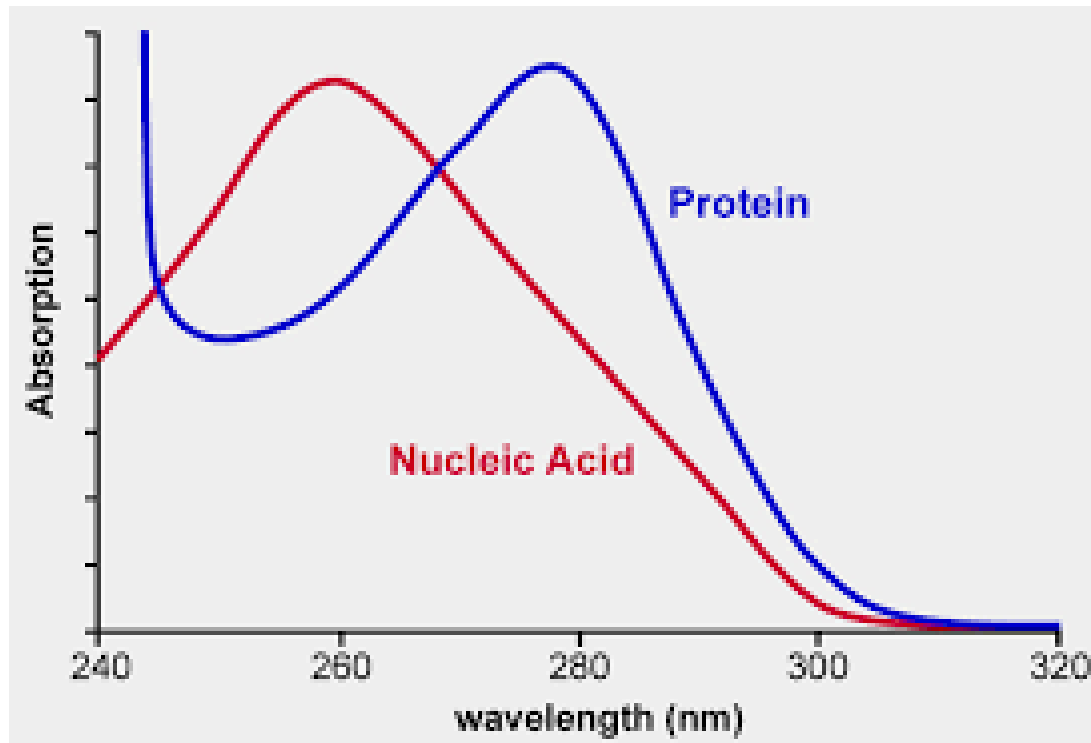
Cuantificación. Criterios de pureza

- ✓ Razón $Abs_{260}/Abs_{280} < 1,8$ sugiere contaminación con proteínas, fenol u otros contaminantes con capacidad de absorción a 280 nm.
- ✓ Razón Abs_{260}/Abs_{280} debe ser de alrededor de 1,8-2.
- ✓ Razón $Abs_{260}/Abs_{280} > 2$ sugiere contaminación con ADN o ARN.



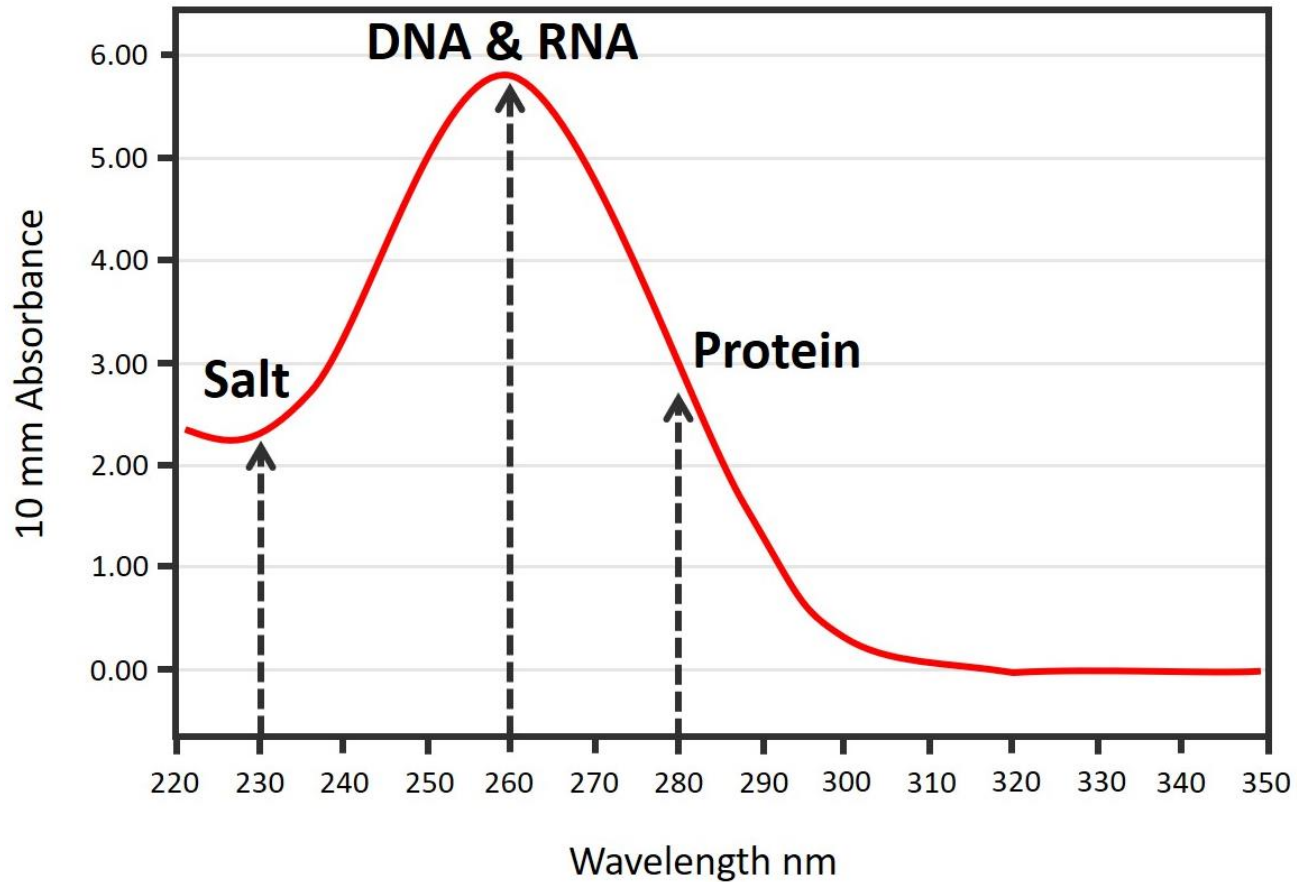
Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Cuantificación. Criterios de pureza



Análisis de cantidad y calidad del ADN/ARN

Cuantificación. Criterios de pureza



Almacenamiento

Conservación del ADN. 4 °C por unos días o a -20 °C para largos periodos.

Conservación del ARN. -80 °C. Deben de evitarse congelaciones y descongelaciones sucesivas y recurrentes.



ESTUDIO DEL GEN *KRAS* EN CÁNCER DE PULMÓN

Marta Cuadros Celorrio (mcuadros@ugr.es)

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Grupo Gene regulation and Cancer (GENYO)

IBS_ Granada

Verónica Arenas Rodríguez (varenas@ugr.es)

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología

Objetivo:

Comprender la importancia del estudio genético en la práctica clínica, su valor diagnóstico, pronóstico y farmacológico.